60

FACULTÉ DE MÉDECINE DE PARIS

Année 1916 — THÈSE — N° —

POUR

LE DOCTORAT EN MÉDECINE

PRÉSENTÉE PAR

ANNIE RAPHAEL

DE

L'IMMUNITÉ ANTIPNEUMOCOCCIQUE

ÉTUDE EXPÉRIMENTALE

Président : M. MARFAN, professeur.

Le candidat répondra aux questions qui lui seront faites sur les diverses parties de l'enseignement médical.

PARIS
IMPRIMERIE DE LA COUR D'APPEL
L. MARETHEUX, Directeur
1, RUE CASSETTE, 1
—
1916

FACULTÉ DE MÉDECINE DE PARIS

Le Doyen	M. LANDOUZY.
Assesseur	M. G. POUCHET.
Professeurs	MM.
Anatomie	NICOLAS.
Physiologie	Ch. RICHET.
Physique médicale	WEISS.
Chimie organique et chimie générale	DESGREZ.
Parasitologie. Histoire naturelle médicale	R. BLANCHARD.
Pathologie et thérapeutique générales	ACHARD.
Pathologie médicale	WIDAL. TEISSIER.
Pathologie chirurgicale	LEJARS.
Anatomie pathologique	Pierre MARIE.
Histologie	PRENANT.
Opérations et appareils	Auguste BROCA.
Pharmacologie et matière médicale	POUCHET.
Thérapeutique	N...
Hygiène	CHANTEMESSE.
Médecine légale	N...
Histoire de la médecine et de la chirurgie	LETULLE.
Pathologie expérimentale et comparée	ROGER.
Clinique médicale	DEBOVE. LANDOUZY. GILBERT. CHAUFFARD.
Maladies des enfants	HUTINEL.
Clinique de pathologie mentale et des maladies de l'encéphale	Gilb. BALLET.
Clinique des maladies cutanées et syphilitiques	GAUCHER.
Clinique des maladies du système nerveux	DEJERINE.
Clinique chirurgicale	Pierre DELBET. QUÉNU. N.. HARTMANN.
Clinique ophtalmologique	DE LAPERSONNE.
Clinique des maladies des voies urinaires	LEGUEU.
Clinique d'accouchements	BAR. COUVELAIRE. RIBEMONT-DESSAIGNES.
Clinique gynécologique	POZZI.
Clinique chirurgicale infantile	KIRMISSON.
Clinique thérapeutique	Albert ROBIN.
Hygiène et clinique de la 1re enfance	MARFAN.

Agrégés en exercice :

MM. ALGLAVE	MM. GUILLAIN	MM. LÉRI	MM. ROUSSY
BERNARD	JEANNIN	LOEPER	ROUVIÈRE
BRANCA	JOUSSET (A.)	MAILLARD	SAUVAGE
BRUMPT	LABBÉ (Henri)	MOCQUOT	SCHWARTZ (A.)
CAMUS	LAIGNEL-LAVASTINE	MULON	SICARD
CASTAIGNE	LANGLOIS	NICLOUX	TANON
CHAMPY	LECÈNE	NOBÉCOURT	TERRIEN
CHEVASSU	LEMIERRE	OKINCZYC	TIFFENEAU
DESMAREST	LENORMANT	OMBRÉDANNE	VILLARET
GOUGEROT	LEQUEUX	RATHERY	ZIMMERN
GRÉGOIRE	LEREBOULLET	RETTERER	
GUÉNIOT		RICHAUD	

Par délibération en date du 9 décembre 1798, l'Ecole a arrêté que les opinions émises dans les dissertations qui lui seront présentées doivent être considérées comme propres à leurs auteurs, et qu'elle n'entend leur donner aucune approbation ni improbation.

A MON MAITRE ET PRÉSIDENT DE THÈSE

M. LE PROFESSEUR MARFAN

MEMBRE DE L'ACADÉMIE DE MÉDECINE

MÉDECIN DE L'HÔPITAL DES ENFANTS MALADES

A M. LE DOCTEUR MAURICE NICOLLE

PROFESSEUR A L'INSTITUT PASTEUR

A MES MAITRES DANS LES HOPITAUX

Monsieur le Docteur SIREDEY.
Monsieur le Docteur CAMPENON.
Monsieur le Docteur RÉNON.
Monsieur le Professeur BAR.

Monsieur le Docteur J.-L. FAURE (1908-1909).
Monsieur le Docteur BOULLOCHE (1909-1910).
Monsieur le Professeur MARFAN (1910-1911); (1914).
Monsieur le Docteur BOURCY (1911-1912).
Monsieur le Docteur RIST (1912-1913).

Monsieur le Docteur L. RAMOND (1914-1915).

A MES MAITRES ET AMIS

Monsieur le Docteur E. BIGART; Monsieur le Docteur Ans. SCHWARTZ.

AVANT-PROPOS

Ce travail a été fait sous la direction de M. Maurice Nicolle, professeur à l'Institut Pasteur. Depuis plus de trois ans qu'il a bien voulu nous admettre dans son laboratoire, M. Nicolle n'a cessé de nous prodiguer ses conseils et de nous faire profiter de sa grande expérience. C'est pour nous une vive satisfaction que de pouvoir lui exprimer ici notre profonde reconnaissance pour tout ce qu'il nous a appris, et pour la bienveillance qu'il nous a invariablement témoignée.

Si nous avons pu donner à nos expériences sur l'Immunité Passive un aussi grand développement, c'est grâce à M. Truche, assistant à l'Institut Pasteur, qui s'est chargé complètement de l'hyperimmunisation des grands animaux, lourde tâche qu'il nous eût été impossible d'assumer nous-même. Il a été pour nous à la fois le plus agréable et le plus utile des collaborateurs.

Notre thèse est en quelque sorte la suite de celle que M. Cotoni a écrite sur « La Virulence des Pneumocoques ». Nous avons eu l'occasion de nous reporter maintes fois à cette étude précise et documentée, et nous remercions cordialement M. Cotoni des nombreux emprunts qu'il nous a permis d'y faire.

Enfin nous n'oublions pas que nous n'aurions pu donner à nos recherches l'ampleur désirable, sans les très grandes facilités de travail que nous avons trouvées à l'Institut Pasteur. Nous prions son directeur, M. Roux, d'accepter l'expression de notre sincère gratitude.

Décembre 1915.

INTRODUCTION

Le pneumocoque venait à peine d'être isolé (Pasteur; 1881), et défini quant à son habitat, son rôle pathogène et ses caractères (Talamon, Fränkel; 1883-86), que l'étude de l'immunité antipneumococcique commençait.

Depuis trente ans, les travaux qui ont paru à ce sujet se sont suivis presque sans interruption. Nous n'avons nullement l'intention de les résumer tous ici. Nous voudrions seulement montrer par quelles étapes a passé cette question, et comment se présentait le problème de l'immunité antipneumococcique quand nous avons entrepris nos recherches.

Dans une première période, allant environ de 1886 à 1896, les auteurs ont essayé *d'immuniser les animaux de laboratoire* contre le pneumocoque. Ils se sont adressés presque exclusivement au lapin. Les uns (Fränkel, Emmerich et Fawitzky, etc.) ont injecté des germes vivants; les autres (les Klemperer, Netter, Foa et Scabia, etc.), des microbes tués par des procédés variés. — Toutes ces expériences ont abouti à démontrer qu'il est possible, et même relativement facile, d'immuniser le lapin, activement, contre le pneumocoque.

Il a fallu ensuite chercher à *hyperimmuniser de grands animaux*, afin d'étudier les propriétés de leurs sérums. Mennes, le premier (1897), y parvint; il obtint un sérum antipneumococcique chez la chèvre et le cheval en leur injectant d'abord des microbes chauffés, puis des cultures vivantes. Peu après, Pane réussit à immuniser l'âne. Plus récemment Römer, puis Neufeld, préparent des sérums chez divers grands animaux; Kind-

borg immunise le mouton. — Les sérums ainsi obtenus sont doués d'une certaine activité, et sont capables de transmettre leurs propriétés aux animaux de laboratoire. Le problème de l'immunité antipneumococcique semblait donc résolu.

Mais on n'a pas tardé à voir que deux pneumocoques, parfaitement authentiques, absolument semblables entre eux quant à leurs caractères morphologiques, culturels, etc., pouvaient ne pas se comporter de façon identique vis-à-vis d'un sérum antipneumococcique, celui-ci immunisant contre l'un d'eux et restant totalement dénué d'effet à l'égard de l'autre.

Cette question ne semble pas avoir préoccupé les premiers expérimentateurs. Leurs travaux sur l'immunité active, où le problème est le même, manquent de précision à ce point de vue. Éprouvaient-ils les animaux avec le même échantillon que celui qui leur avait servi à les vacciner? Faisaient-ils au contraire l'épreuve avec un échantillon différent? Il est impossible de le savoir. Seul Pio Foa, dès 1893, remarque qu'un lapin, immunisé avec un pneumocoque provenant d'un pneumonique, résiste à l'épreuve si on la fait avec ce même germe, mais succombe si on lui injecte un pneumocoque de méningite; et *vice versa*, le pneumocoque de méningite ne vaccinant pas contre celui de pneumonie.

En ce qui concerne l'immunité passive, les avis sont partagés. Pour quelques auteurs (Kindborg) les sérums antipneumococciques sont strictement *monovalents* : un sérum n'agit que sur l'échantillon qui a servi à le préparer; vis-à-vis de toute autre race, il se comporte comme du sérum normal. — Pour d'autres (Neufeld), les pneumocoques forment un certain nombre de *groupes* (au moins quatre); chaque germe d'un même groupe fournit un sérum qui protège contre tous les échantillons de ce groupe, mais n'exerce pas la moindre action sur les échantillons des autres groupes. Il n'y aurait donc pas monovalence absolue, mais il n'y aurait pas non plus, à proprement parler, polyvalence. — Enfin, pour certains auteurs (Dochez et Gillespie), il y a bien en effet des pneumocoques qui forment des groupes, mais il y a aussi des échantillons qui res-

tent rigoureusement individualisés, le sérum préparé avec l'un quelconque d'entre eux n'immunisant contre aucun autre échantillon.

Ces opinions contradictoires montrent que le problème de l'immunité antipneumococcique est loin d'avoir été résolu, et qu'il méritait d'être repris ; c'est ce que nous avons voulu faire dans cette étude.

Nous nous sommes efforcée surtout d'établir les rapports qui existent entre les pneumocoques au point de vue du pouvoir immunisant, et de définir la loi qui, dans certaines limites, régit ces rapports.

De nombreuses expériences ont été instituées dans ce but. Les unes ont trait à l'*Immunité Active*, les autres à l'*Immunité Passive* ; l'exposé et la discussion de ces expériences constituent la partie essentielle de notre travail.

Mais il nous a paru indispensable de donner d'abord, aussi succinctement que possible, quelques notions de *technique générale* ; nous avons résumé ensuite les *caractères des échantillons* employés dans nos recherches. Pour la rédaction de ces préliminaires, nous avons largement emprunté à la thèse de M. Cotoni, qui nous a été très précieuse.

Enfin, dans un dernier chapitre, transportant dans la pratique les connaissances que nous venions d'acquérir, nous avons indiqué quelle marche nous semblait devoir être suivie dorénavant pour la *préparation d'un sérum antipneumococcique*.

CHAPITRE PREMIER

TECHNIQUE GÉNÉRALE

I° MILIEUX DE CULTURE

Les milieux que nous avons employés sont les suivants :

Milieu T. — Ce n'est pas autre chose qu'une eau peptonisée, salée et glucosée. Sa préparation est aisée. Dans un litre d'eau distillée, chauffée au bain-marie à 80° environ, on dissout 40 grammes de peptone Chapoteaut, 5 grammes de sel marin et 2 grammes de glucose pure. Il faut alcaliniser avec de la lessive de soude jusqu'à coloration légèrement rose de la phénol-phtaléine, porter 5 minutes à l'ébullition, puis filtrer, répartir et stériliser un quart d'heure à 110°.

[Pour la fabrication de ce milieu, la peptone Chapoteaut (albumoses + peptone) ne doit être remplacée ni par la peptone Witte (albumoses) ni par la peptone Defresne (peptone + peptides).]

Milieu S. — Ne diffère du précédent que parce qu'il ne renferme que 1 gramme de glucose (au lieu de 2) par litre.

Milieu T-Ascite. — Renferme, pour deux parties de milieu T, une partie de liquide d'ascite recueilli aseptiquement et, de préférence, non filtré.

Gélose T. — Elle se fait avec le milieu T auquel on ajoute 20 grammes de gélose par litre. La dissolution terminée, on alcalinise le mélange, jusqu'à teinte franchement violette du

tournesol ; il ne reste plus qu'à répartir et à stériliser pendant vingt minutes à 110°. (La suppression de la filtration, tout en simplifiant la technique, a l'avantage de rendre le milieu plus nutritif.) Avant de sortir les tubes de l'autoclave pour les incliner, on attend environ une demi-heure : les flocons les plus volumineux, qui obscurcissent la gélose, se déposent au fond des tubes ; on a ainsi, malgré l'absence de filtration, un milieu d'une transparence très suffisante.

Gélatine T. — Dans un litre de milieu T, dissoudre, au bain-marie, 150 grammes de gélatine ; refroidir à 55° ; ajouter un blanc d'œuf ; alcaliniser ; stériliser un quart d'heure à 115° ; filtrer, répartir et stériliser vingt minutes à 110°.

2° INDICATIONS ET MODE D'EMPLOI DE CES MILIEUX

Chacun d'eux s'applique, en effet, à des cas bien déterminés que nous allons passer successivement en revue (1).

Isolement. — S'agit-il d'un produit présumé *pur*, tel que du sang recueilli aseptiquement, on l'ensemence directement en milieu T. On pourra, ensuite, faire une culture sur gélose, de manière à obtenir des colonies isolées que l'on repiquera de nouveau en milieu liquide. Cette technique, excellente en principe, présente cependant des inconvénients. La culture sur gélose inclinée impose, en effet, aux microbes des conditions d'aération qui ont trop souvent pour résultat une chute rapide de la virulence. Nous préférons n'avoir recours à la gélose que pour nous assurer de la pureté de notre culture massive en milieu T ; mais c'est cette première culture elle-même que nous considérons comme « culture-origine » de notre échantillon et que nous cherchons à conserver par les moyens que nous indiquerons plus loin.

S'agit-il, au contraire, d'un produit *impur*, un crachat pneu-

(1) Pour plus de détails nous renvoyons à la thèse de M. Cotoni (*La virulence des pneumocoques*, 1912) et aux publications de MM. Truche et Cotoni dans les *Annales de l'Institut Pasteur* (juin 1911 ; janvier 1912).

monique par exemple, il est indispensable de faire l'isolement sur gélose T. On repiquera ensuite une colonie en milieu liquide; emploie-t-on pour cela le milieu T, il arrive assez souvent que le repiquage est négatif; c'est à ce cas que nous réservons l'emploi du milieu T-ascite, avec lequel il est exceptionnel d'avoir un échec. Après ce premier passage en T-ascite, on pourra d'ailleurs, sans crainte, revenir au milieu T.

Que l'on soit parti d'un produit pur ou impur, on aboutit donc à une culture liquide, « culture-origine » qu'il va falloir conserver quant à sa vitalité et sa virulence.

Conservation. — Il est habituel de dire que le pneumocoque est d'une fragilité extrême et que l'entretien de ses cultures exige des soins presque quotidiens. Il n'en est rien cependant. Le problème de la conservation du pneumocoque a été fort bien résolu grâce à la méthode employée par MM. Truche et Cotoni; cette méthode n'est d'ailleurs qu'une application au pneumocoque du procédé imaginé par M. Nicolle et Adil-bey pour la conservation du virus de la peste bovine.

La technique est la suivante : on fait fondre à 37° un tube de gélatine T; on y introduit ensuite quelques centimètres cubes de la culture à conserver de telle façon que, pour deux parties de gélatine, il y ait une partie de culture. On secoue légèrement de manière à former un mélange bien homogène des deux liquides. Il ne reste plus qu'à sceller le tube et à le mettre à la glacière.

(Nous avons remplacé par la gélatine T la gélatine à l'eau physiologique employée par MM. Truche et Cotoni. Petit perfectionnement de détail sur lequel il est inutile d'insister.)

Repiquages. — Les cultures gélatinées seront repiquées : soit pour en assurer la conservation; soit pour obtenir une culture jeune, dans un but d'expérimentation. Envisageons d'abord le premier de ces deux cas.

Il est recommandable de procéder au repiquage le moins souvent possible. En règle générale, le pneumocoque se conserve dans la gélatine pendant un an au moins; un *repiquage annuel* sera donc suffisant. (Pour quelques rares échantillons, plus fragiles, il sera cependant prudent de ne pas dépasser six mois.) — Le tube à repiquer est mis à l'étuve ou au bain-marie à 37° de

manière à fluidifier la culture gélatinée. On en prélève ensuite, au moyen d'une pipette, 2 ou 3 cent. cubes que l'on introduit dans un tube de milieu T (ou de T-ascite, s'il s'agit d'échantillons très fragiles). Le plus souvent, en dix-huit à vingt-quatre heures, on obtient une culture abondante (quelquefois il y a un léger retard). On repique en milieu T, de manière à obtenir un rajeunissement plus parfait; et cette deuxième culture, « petite-fille de gélatine », est mélangée de nouveau à de la gélatine et mise, en tube scellé, à la glacière, où elle restera jusqu'au prochain repiquage.

On aura donc la série :

Gélatine — culture fille (T ou T-ascite) — culture petite-fille (T) — gélatine.

S'agit-il d'obtenir une culture pour faire une *expérience*, on procédera à peu près de la même façon. Nous croyons utile, toutefois, de décrire notre technique en détail et d'expliquer pourquoi nous l'avons adoptée.

Quand on fait un grand nombre d'expériences, à peu de jours d'intervalle, avec le même échantillon, ce qui a été notre cas, on est tenté soit de puiser plusieurs fois dans le même tube de culture gélatinée, soit de continuer indéfiniment les réensemencements de manière à avoir toujours une culture jeune à sa disposition. On s'expose, en agissant de la sorte, aux deux accidents suivants : 1° les cultures deviennent misérables ou s'arrêtent complètement; les germes sont donc atteints dans leur *vitalité*; 2° la *virulence* devient irrégulière, ou baisse plus ou moins rapidement.

Or, pour nos expériences, il était indispensable de pouvoir obtenir, à jour fixe, des cultures d'une abondance et d'une activité constantes. Tous ceux qui se sont occupés du pneumocoque savent que le problème n'est pas d'une solution aisée. Nous nous sommes fort bien trouvée de la méthode suivante que nous avons rigoureusement appliquée dans tout le cours de cette étude.

Un échantillon doit-il servir à de fréquentes expériences, nous faisons un grand nombre de tubes de cultures gélatinées, de manière à avoir une provision suffisante pour plusieurs mois. *Chaque tube est destiné à être le point de départ d'une expérience*,

et ne sera utilisé qu'une seule fois; on le jettera dès qu'il aura été repiqué.

On a vu plus haut que, pour le repiquage annuel, il faut ensemencer la culture gélatinée en milieu T ou T-ascite ; il est indispensable, en effet, d'avoir recours à un milieu très nutritif, puisqu'il s'agit de favoriser au maximum le réveil de germes maintenus depuis une année à l'état de vie latente. Mais dans le cas actuel, il n'en n'est plus de même ; les cultures gélatinées dont nous avons fait provision sont de date plus récente et ne demandent qu'à « repartir » même dans un milieu relativement pauvre. Or, des observations répétées nous ont montré qu'il est toujours préférable, si possible, de ne pas faire deux passages consécutifs en un milieu très riche tel que le milieu T ; la deuxième culture est presque constamment plus maigre que la première, souvent elle est complètement autolysée ; on comprend ce que devient la virulence en pareil cas.

C'est afin d'obvier à ce danger que nous employons, pour le premier rajeunissement des cultures gélatinées, le *milieu S* ; plus pauvre que le milieu T, il est assez nutritif, cependant, pour que la multiplication des germes, quoique modérée, s'y fasse sans retard. Nous réservons l'emploi du milieu T à la deuxième culture, qui est, dans ces conditions, d'une abondance remarquable, et présente une virulence relativement fixe.

On a donc la série de cultures suivante :

Gélatine — culture fille (S) — culture petite-fille (T).

C'est la culture « petite-fille » qui sera utilisée dans les expériences.

CHAPITRE II

CARACTÈRES DES PNEUMOCOQUES ÉTUDIÉS DANS CE TRAVAIL

Ce travail a été fait essentiellement avec neuf échantillons de pneumocoques. Ces échantillons n'ont pas été pris au hasard, mais choisis avec soin pour des motifs bien déterminés.

I° ORIGINES

Voici les noms, dates d'isolement et origines des races étudiées.

1° **Pneumocoque A.** — (Décembre 1909). Crachat pneumonique.

2° **Pneumocoque H.** — (Janvier 1911). Crachat pneumonique.

3° **Pneumocoque 286.** — (Octobre 1911). Crachat pneumonique.

4° **Pneumocoque 312.** — (Mai 1912). Crachat pneumonique.

Ces quatre races font partie de la collection rassemblée par MM. Truche et Cotoni.

5° **Pneumocoque F.** — Nous ignorons la date d'isolement et l'origine précise de cet échantillon. Il nous fut donné par M. Flexner, que nous sommes heureuse de pouvoir remercier ici pour l'envoi obligeant de ce pneumocoque et du sérum correspondant.

6° **Pneumocoque N.** — Le professeur Neufeld a bien voulu

nous envoyer un échantillon de pneumocoque. Nous lui devons également quelques centimètres cubes de son sérum ainsi que l'adresse de la fabrique où nous avons pu en acheter la quantité nécessaire à nos expériences. Nous ne saurions trop le remercier.

7° **Pneumocoque L 1**. — (Décembre 1912). Isolé du sang du cœur d'un lapin mort après avoir reçu du venin de crotale.

8° **Pneumocoque L 2**. — (Février 1913). Isolé du sang du cœur d'un lapin mort spontanément.

9° **Pneumocoque C 5**. — (Mars 1913). Isolé du cerveau d'un cobaye mort spontanément.

Quelques mots d'explication sont nécessaires pour ces trois derniers échantillons. Depuis plusieurs années, M. Nicolle a appelé l'attention sur la fréquence des affections à pneumocoques chez le lapin et le cobaye. Ses observations ont été abondamment confirmées par les recherches de MM. Truche et Coloni, et par les nôtres. L'infection pneumococcique peut être *primitive*, *spontanée*, déterminant alors la « maladie du nez » chez le cobaye, ou une septicémie rapidement mortelle chez le lapin. C'est à deux cas de ce genre que nous devons nos échantillons L 2 et C 5. L'infection peut aussi être *secondaire*. L'expérience qui nous a permis d'isoler la race L 1 en est un exemple typique : un lapin, jusque-là bien portant, reçoit du venin de crotale ; sous l'influence de ce poison, la résistance de l'animal fléchit, et des germes, qui vivaient sans doute à l'état saprophytique en quelque point de ses muqueuses, envahissent son organisme et déterminent la mort. Cette « sortie » des pneumocoques est d'observation courante quand on injecte à un animal une substance quelconque le mettant en état de débilitation. (A noter que le pneumocoque « de sortie » se rencontre aussi, quoique plus rarement, chez la souris.)

2° MORPHOLOGIE. CARACTÈRES DES CULTURES

Morphologie. — Tous nos pneumocoques se présentent sous la forme de diplocoques lancéolés, « en flamme de bougie » selon la comparaison classique. Cet aspect est particulièrement appa-

rent quand les germes se trouvent dans un milieu albumineux : humeurs des animaux d'expérience ou bouillon de culture contenant du liquide d'ascite. Dans les autres milieux, l'on peut constater, exceptionnellement d'ailleurs, quelques légères anomalies. Le pneumocoque A s'allonge volontiers, revêtant ainsi une forme presque bacillaire. L'échantillon 286 présente généralement, en milieu T, de très longues chaînettes, pouvant égarer le diagnostic d'un observateur non exercé. Il suffit d'un peu d'attention pour remarquer que ces chaînettes sont constituées par des diplocoques lancéolés typiques simplement placés bout à bout. En résumé, au point de vue morphologique, aucun de nos échantillons ne soulève de problème embarrassant.

Caractères des cultures. — Il ne sera question ici que des caractères en milieu T et sur gélose T.

En milieu T, le pneumocoque a une abondance variable, mais toujours bien supérieure à celle qu'on a coutume de lui voir dans le bouillon ordinaire. On se fera une idée de la richesse des cultures en sachant que, pour certaines races (l'échantillon A, par exemple), le dépôt de 10 cent. cubes, obtenu par centrifugation, représente environ 3 centigrammes de matière microbienne ; c'est là, d'ailleurs, un chiffre extrême, rarement atteint. D'une façon plus générale, on peut distinguer deux types de culture, type « maigre » et type « gras », dont les abondances sont entre elles, approximativement, comme les nombres 1 et 1,5. — Le pneumocoque se développe en troublant uniformément le milieu ; un léger dépôt, aisément émulsionnable par agitation du tube, s'observe parfois.

Sur gélose T, la plupart de nos échantillons forment des colonies transparentes, très fines, et qu'on ne peut guère voir qu'à jour frisant. Certaines races s'écartent de ce type classique en « goutte de rosée » et présentent des colonies beaucoup plus volumineuses et moins transparentes : c'est le cas du pneumocoque A.

3° VITALITÉ

Nous n'avons pas étudié systématiquement la sensibilité du pneumocoque aux divers agents de destruction ; nous avons eu l'occasion, cependant, de constater certains faits intéressants.

Tous nos échantillons se sont montrés sensibles à **l'acidification** des milieux de culture ; plusieurs d'entre eux, en particulier les races H et 286, sont d'un maniement très délicat à ce point de vue ; le moindre excès d'acidité arrête la culture et rend même parfois le repiquage impossible. C'est à cause de cette grande susceptibilité que nous avons dû donner à nos milieux glucosés une forte alcalinité.

Tous les pneumocoques que nous avons eus entre les mains supportent parfaitement le séjour prolongé à **basse température**. La conservation en gélatine à la glacière pendant des mois en est une preuve.

Vis-à-vis de la **chaleur**, au contraire, les échantillons que nous avons étudiés à cet égard se comportent des façons les plus diverses. A l'étuve à 37°, tandis que les pneumocoques H et 286 meurent rapidement (en quelques jours), le pneumocoque 312 a pu être conservé sept mois sans diminution de sa vitalité ; repiqué au bout de ce temps, il a donné, en vingt-quatre heures, une culture d'abondance normale. Même résultat avec la race A, mais ici c'est malgré *plusieurs années* de conservation à l'étuve que le repiquage a été positif. — Chauffés une demi-heure au bain-marie à 55°, les échantillons H, 286, F, 312, meurent constamment. Quant au pneumocoque A, non seulement il ne succombe pas à cette température, mais encore un chauffage *d'une heure à 80°* ne suffit pas pour tuer ce germe d'une résistance vraiment extraordinaire.

4° VIRULENCE

Virulence pneumococcique en général. — (Tous les titrages ont été faits sur des souris blanches de 16-20 grammes, des lapins de 1 kil. 600 à 2 kilogrammes et des cobayes de 400 à 500 grammes. Inoculations sous-cutanées ou intramusculaires. Les cultures employées sont des cultures de vingt à vingt-quatre heures en milieu T.)

Si l'on étudie la virulence des pneumocoques vis-à-vis de la souris, du lapin et du cobaye, on arrive à constituer les quatre groupes suivants :

1° Pneumocoques AVIRULENTS. Nous désignons ainsi les germes qui, à la dose de 1 cent. cube, ne tuent aucun de ces animaux.

2° Pneumocoques VIRULENTS POUR LA SOURIS (à la dose de 1 cent. cube au moins), avirulents pour le lapin et le cobaye.

3° Pneumocoques VIRULENTS POUR LA SOURIS ET LE LAPIN, avirulents pour le cobaye.

4° Pneumocoques VIRULENTS POUR LA SOURIS, LE LAPIN ET LE COBAYE.

Jamais nous n'avons isolé d'échantillon virulent pour le cobaye, qui ne le fût pas pour le lapin et la souris ; ni virulent pour le lapin et non pour la souris.

En d'autres mots, la virulence pour le lapin implique celle pour la souris ; de même, la virulence pour le cobaye implique la virulence pour le lapin, et, *a fortiori*, pour la souris. Il y a donc une échelle de virulence à trois échelons.

Virulence de nos échantillons « au départ ». — Les échantillons qui nous ont servi à faire ce travail et que nous avons énumérés plus haut, ont tous été titrés, lors de leur isolement, sur les trois espèces animales.

TABLEAU I. — **Virulence pour la souris, le lapin et le cobaye des 9 pneumocoques étudiés dans ce travail.**

SIGNALEMENT de l'échantillon.	DOSE MORTELLE pour la souris.	DOSE MORTELLE pour le lapin.	DOSE MORTELLE pour le cobaye.
A	1 cent. cube.	Avirulent.	Avirulent.
H	10^{-10} c. cube (1).	Avirulent.	Avirulent.
N	10^{-7} cent. cube.	10^{-5} cent. cube.	Avirulent.
F	10^{-7} —	10^{-5} —	Avirulent.
C5	10^{-2} —	10^{-5} —	1 cent. cube.
L1	10^{-2} —	10^{-4} —	1 —
L2	10^{-7} —	10^{-5} —	1 —
286	10^{-11} —	10^{-7} —	1 —
312	10^{-7} —	10^{-8} —	10^{-1} —

(1) $10^{-10} = \frac{1}{10^{10}} = \frac{1}{10.000.000.000}$.

(Les pneumocoques L 1, L 2 et C 5, cependant, n'ont été titrés sur la souris qu'au bout de plusieurs mois de conservation.)

C'est ce que nous appellerons la virulence « au départ ». Elle est résumée dans le tableau 1. Dans ce tableau comme dans la suite de notre travail, nous désignerons les doses de 1/10 de cent. cube, 1/100, 1/1.000.... 1/10.000.000.000 de cent. cube, de la façon suivante : 10^{-1}, 10^{-2}, 10^{-3}... 10^{-10} cent. cube.

Si l'on examine ce tableau, on voit que :

1° Les races A et H sont virulentes (mais à des degrés très différents) exclusivement pour la souris ;

2° Les pneumocoques N et F sont des types de pneumocoques virulents pour le lapin ;

3° Tous les autres échantillons manifestent leur activité vis-à-vis des trois espèces animales.

Conservation de la virulence. — Les nombreuses expériences qui font l'objet de ce travail portent sur une durée de plusieurs années. On comprend, dès lors, avec quelle insistance s'est posé pour nous le problème de la conservation de la virulence.

Tous nos pneumocoques ont été gardés, depuis leur isolement, en gélatine, à la glacière, selon la technique décrite au chapitre précédent. Ils ont été titrés fréquemment, de sorte qu'il a été facile de suivre les modifications de leur activité. D'une façon générale, nous avons obtenu des résultats excellents, supérieurs, sans aucun doute, à ceux que donnent tous les autres procédés de conservation employés jusqu'à présent. C'est ainsi, par exemple, que, dix-huit mois après son isolement, le pneumocoque 312 tuait encore le lapin à la dose infime de 10^{-9} cent. cube ; de même la virulence des races F et L 2 s'est maintenue intégralement, malgré un séjour de dix à douze mois à la glacière.

Nous ne prétendons pas, cependant, avoir à notre disposition une méthode rigoureusement infaillible. Nous avons eu à enregistrer quelques insuccès partiels ; mais ils dépendent moins, croyons-nous, de l'imperfection de la méthode, que d'autres facteurs dont le plus important nous a paru être la variabilité extrême des peptones que l'on trouve dans le commerce. Notre milieu de conservation n'est guère autre chose, on s'en souvient, que de l'eau gélatinée additionnée d'une forte proportion de peptone. Les insuccès auxquels nous venons de faire allusion ont eu lieu au moment précis où, de l'aveu même du fabricant, la préparation de la peptone avait subi des modifications. Il a

suffi de revenir au procédé habituel de fabrication pour voir s'aplanir les difficultés.

Quoi qu'il en soit, chez deux de nos échantillons (H et 286), la virulence a baissé d'une façon incontestable. A la fin de nos expériences, le pneumocoque H tuait la souris à 10^{-2} cent. cube ; le pneumocoque 286 tuait la souris à 10^{-6} cent. cube et le lapin à 10^{-2} cent. cube, il était devenu inoffensif pour le cobaye. — Il n'est pas question, on le voit, d'une perte complète d'activité ; il ne s'agit que d'une diminution, et rien ne prouve qu'elle soit définitive. On peut voir, en effet, des oscillations très curieuses de virulence chez les germes conservés à la glacière. L'échantillon A en est un exemple intéressant : très peu actif « au départ » pour la souris (dose mortelle = 1 cent. cube), il n'a pas tardé à devenir avirulent ; puis la virulence a remonté, et au bout d'un an, ce pneumocoque tuait la souris à 10^{-2} cent. cube ; nouveau fléchissement, très accusé cette fois, puisque, deux ans après l'isolement, on pouvait injecter, dans le péritoine de la souris, le culot obtenu par centrifugation de 40 cent. cubes de culture, sans déterminer aucun trouble chez cet animal ; l'année suivante, la virulence était redevenue ce qu'elle était « au départ ».

Relations de la virulence avec les autres propriétés. — On a vu que l'**abondance des cultures** de pneumocoques est variable Le type « maigre » en milieu T n'a été rencontré par nous que chez les échantillons virulents (cas de H et de 286). La réciproque n'est pas vraie : plusieurs races virulentes (312, L 2) donnent des cultures très abondantes en milieu T.

De même, la **fragilité** des cultures est un apanage des espèces virulentes. Ici encore, la réciproque n'est pas vraie, car on peut rencontrer des échantillons très actifs et très robustes.

Beaucoup plus importants sont les rapports qui existent entre la virulence des pneumocoques et leur **solubilité dans la bile**. On sait que Neufeld a observé, en 1900, qu'une culture liquide de pneumocoque, additionnée de bile de lapin, s'éclaircit très rapidement par dissolution des germes : l'examen microscopique, les ensemencements et les inoculations demeurent négatifs. M. Nicolle et Adil-bey ont montré que les sels biliaires agissaient sur le pneumocoque de la même façon que la bile de

lapin. Dans une monographie récente, Neufeld et Händel font remarquer que la propriété de se dissoudre dans la bile n'appartient qu'aux échantillons virulents.

En collaboration avec MM. Truche et Cotoni (1), nous avons fait une étude approfondie de cette question, et nous sommes arrivés à la même notion. Voici les conclusions que nous avons formulées :

« En résumé, une grande virulence, caractérisée par la mort du lapin (et, à plus forte raison, du cobaye) et par celle de la souris pour des doses minimes, va toujours de pair avec la solubilité dans la bile ; une avirulence totale, avec l'insolubilité ; une virulence faible ou médiocre, tantôt avec la solubilité complète ou partielle, tantôt avec l'insolubilité. »

TABLEAU II. — **Variations de la virulence et de la solubilité dans la bile chez le pneumocoque A.**

DATE DU TITRAGE et de l'épreuve par la bile.	DOSE MORTELLE pour la souris.	ÉPREUVE de la bile.
1909 (Décembre) . . .	1 cent. cube.	Soluble.
1910 (Juillet)	Avirulent.	Insoluble.
1910 (Décembre) . . .	10^{-2} cent. cube.	Soluble.
1911 (Décembre) . . .	Avirulent.	Insoluble.
1913 (Décembre) . . .	1 cent. cube.	Insoluble.

Les neuf échantillons dont nous venons d'étudier la virulence étaient tous, lors de leur isolement, solubles dans la bile. Tous le sont restés ultérieurement, sauf le pneumocoque A. On a vu que la virulence de ce microbe a varié, tantôt en plus, tantôt en moins, depuis l'isolement. Le tableau 2 permettra de comparer les modifications de la solubilité et celles de la virulence. On voit que les deux propriétés ont d'abord varié dans le même sens ; il y a, en fin de compte, retour à la virulence initiale sans réapparition de la solubilité dans la bile. Il serait intéressant de voir si, dans ce cas, le relèvement de la virulence n'est pas accom-

(1) *Annales de l'Institut Pasteur*, octobre 1913.

pagné de l'apparition de la solubilité pour des agents plus énergiques que la bile.

5° INFLUENCE DES PASSAGES SUR LA VIRULENCE

Les passages en série par les animaux sont généralement considérés comme un bon moyen d'augmenter la virulence des microbes. De nombreuses et longues expériences ont été entreprises dans le laboratoire de M. Nicolle, afin d'étudier l'action des passages sur la virulence des pneumocoques (1). De tous ces documents, nous ne rapporterons ici que ceux qui se rapportent aux races 286 et 312.

Technique suivie. — Une « culture-origine » en milieu T est inoculée à un premier animal. Celui-ci étant mort, on ensemence son cerveau en milieu T, on place à 37°, et, le lendemain, on prélève purement pour l'inoculation suivante. Le reste de la « culture-cerveau », additionné de gélatine, est conservé à la glacière. Et ainsi de suite.

Pneumocoque 286. — Des passages ont été faits par trois espèces animales (souris, lapin, cobaye). Les cultures étaient inoculées dans les muscles chez la souris et le lapin, dans le testicule chez le cobaye. Pour chacune des trois variétés ainsi obtenues (286 Souris, 286 Lapin, 286 Cobaye ou, plus brièvement, 286 S, 286 L et 286 C), la virulence était titrée, tous les dix passages, et quelquefois plus souvent, sur les trois espèces (souris, lapin, cobaye).

Nous ne nous attarderons pas à résumer les faits, parfois très curieux du reste, observés à chacun de ces titrages. Nous nous bornerons à donner les résultats obtenus après 80 passages par souris, 92 par lapins, 80 par cobayes (voir tableau 3).

(Rappelons que le pneumocoque 286 — que nous désignerons dorénavant sous le nom de 286 Origine ou 286 O — est un des deux échantillons dont la virulence pour le lapin et le cobaye a rapidement baissé à la glacière ; le fléchissement était déjà très net avant le début des passages.)

On voit par le tableau ci-contre qu'il n'y a pas lieu de considérer

(1) Truche et Cotoni, *Annales de l'Institut Pasteur*, avril 1913.

séparément les différentes variétés ; chez les trois, la virulence a considérablement baissé pour la souris, elle n'a pas remonté pour le cobaye, elle a augmenté légèrement pour le lapin (si l'on tient compte du fléchissement indiqué plus haut) sans atteindre toutefois la virulence « au départ ». Les variétés 286 L, S et C présentent donc la curieuse particularité d'être moins virulentes pour la souris, espèce cependant particulièrement sensible, que pour le lapin, animal habituellement beaucoup plus résistant vis-à-vis du pneumocoque. — Dans aucun cas on n'a pu constater d'exaltation proprement dite de la virulence. Toutes les expériences analogues faites dans le laboratoire de M. Nicolle ont abouti au même résultat négatif. Nous n'avons observé qu'une seule exception ; elle se rapporte à l'échantillon 312.

Tableau III. — **Virulence des 3 variétés du pneumocoque 286 obtenues par passages.**

SIGNALEMENT des variétés.	DOSE MORTELLE pour la souris.	DOSE MORTELLE pour le lapin.	DOSE MORTELLE pour le cobaye.
286 S. (80 passages par souris). . . .	1/2 c. cube.	10^{-4} c. cube.	Avirulent.
286 L. (92 passages par lapins). . . .	10^{-1} c. cube.	10^{-4} c. cube.	Avirulent.
286 C. (80 passages par cobayes). . .	10^{-1} c. cube.	10^{-3} c. cube.	Avirulent.

Pneumocoque 312. — (Nous le désignerons, lui aussi, dorénavant, sous le nom de 312 Origine ou 312 O). Les passages n'ont été faits que chez le cobaye : animaux de 250 à 350 grammes pour les 10 premiers passages, de 400 à 550 grammes pour les 20 suivants. Les cultures étaient inoculées sous la peau (jusqu'au 20e passage), puis dans les muscles. Tous les 10 passages, la variété 312 Cobaye (= 312 C) ainsi obtenue a été titrée sur souris, lapin et cobaye. Le tableau 4 résume les résultats obtenus par 30 passages ; il met en évidence à la fois la persistance de l'activité vis-à-vis de la souris et du lapin, et une *exaltation manifeste* de la virulence pour le cobaye. Le pneumocoque 312 O tue, en effet, cet animal à la dose de 10^{-1} cent. cube : il suffit d'une dose dix mille fois moindre (10^{-5}) de la variété 312 C

pour déterminer la mort. — Les passages ont été continués jusqu'au 50e. La virulence s'est d'abord maintenue ; puis, à partir du 40e passage environ, elle a commencé à fléchir, lentement du reste.

Tableau IV. — **Virulence de la variété du pneumocoque 312 obtenue par passages par cobayes.**

SIGNALEMENT de la variété.	DOSE MORTELLE pour la souris.	DOSE MORTELLE pour le lapin.	DOSE MORTELLE pour le cobaye.
312 C. (30 passages par cobayes). . .	10^{-7} c. cube.	10^{-5} c. cube.	10^{-5} c. cube.

De ces deux séries d'expériences, et de beaucoup d'autres faites sur le même type, on peut tirer les conclusions suivantes :

Il est possible d'augmenter la virulence du pneumocoque par les passages en série.

Mais cette méthode est éminemment infidèle ; l'échec est la règle, le succès la très grande exception.

Alors même que la virulence augmente ou se maintient pour une espèce animale, elle peut baisser pour une autre, habituellement plus sensible cependant que la première. Les virulences artificielles que l'on obtient ainsi défient toute classification. Elles ne sont pas comparables à celles que l'on observe dans la nature, et ce qui est vrai des unes peut ne point l'être des autres.

*
* *

Nous voici arrivée au terme de ces longs préliminaires. Si nous leur avons fait une si large place, si nous avons insisté sur tant de points de détail, c'est pour n'avoir plus à y revenir dans la suite.

Il ne sera question dorénavant que de ce qui fait l'objet proprement dit de ce travail : l'Immunité antipneumococcique.

CHAPITRE III

IMMUNITÉ ACTIVE

Nous avons étudié l'immunité active chez la souris et chez le lapin.

I° EXPÉRIENCES SUR LA SOURIS

Il s'agit de souris blanches, mâles, pesant de 16 à 20 grammes.

Immunisation. — Le **vaccin** est préparé de la manière suivante. On centrifuge, à l'aide de l'appareil de Jouan, une culture de vingt-quatre heures en milieu T. Le culot ainsi obtenu est émulsionné dans de l'eau physiologique, de telle façon que 1 cent. cube d'eau physiologique contienne le culot de 10 cent. cubes de culture. L'émulsion est chauffée en tube scellé, pendant une demi-heure, à 55°; la stérilité est ensuite vérifiée par la culture.

La **dose** injectée à chaque souris a varié : culots de 3, 5 ou 10 cent. cubes en une fois.

La **voie** sous-cutanée a été seule utilisée.

Deux **échantillons** ont été employés, séparément, pour la vaccination : H et 312 O.

Les souris ont fort bien **supporté l'immunisation**. Sur 41 souris vaccinées, nous n'en avons perdu que deux; les autres n'ont même pas maigri. Fait curieux, une des deux souris mortes avant l'épreuve a succombé à une infection pneumococcique : exemple frappant de ces pneumocoques « de sortie » dont nous avons parlé plus haut.

Épreuve. — Les souris ont été groupées en lots qui ont été éprouvés respectivement **cinq, dix, quinze et vingt jours** après la vaccination.

Ici encore on n'a eu recours qu'à la **voie** sous-cutanée.

Les animaux immunisés avec **l'échantillon 312 O** ont reçu, à l'épreuve, 10^{-3} cent. cube du même pneumocoque; ceux qui avaient été vaccinés avec la race II ont été éprouvés avec 10^{-2} cent. cube du pneumocoque II. Nous n'avons pas fait d'expériences d'immunité croisée.

Résultats. — Sur 39 souris vaccinées, 3 seulement ont résisté à l'épreuve; une autre est morte avec retard (voir tableau 5). Les rares succès ne semblent en rapport ni avec le moment choisi pour l'épreuve, ni avec la dose employée pour la vaccination.

TABLEAU V. — **Immunité active chez la souris.**

	DOSE de vaccin.	ÉPREUVE après 5 jours.	ÉPREUVE après 10 jours.	ÉPREUVE après 15 jours.	ÉPREUVE après 20 jours.
312 O contre 312 O	3 c. cubes.	+ —	— —		
	5 c. cubes.	— —	+ — — —	+ —	—
	10 c. cubes.	— —	— —	— —	— —
II contre II	5 c cubes.	— —	— —	— —	— —
	10 c. cubes.	— ...	— —	— —	— —

Chaque signe correspond à une souris.
+ : Survie ... : Mort avec retard — : Mort en même temps que les témoins.

Si l'on réfléchit à l'énormité de cette dose, rapportée au poids de l'animal, on conclura sans hésitation *qu'il est extrêmement difficile, voire même impossible, d'immuniser la souris contre le pneumocoque.*

Certains auteurs auraient, il est vrai, obtenu jadis des résultats satisfaisants en injectant à la souris des organes desséchés d'ani-

maux ayant succombé à la septicémie pneumococcique. Sans vouloir mettre en doute l'exactitude de leurs observations, nous nous permettrons cependant de faire remarquer que ce procédé d'immunisation est beaucoup moins rigoureux que celui employé par nous. On peut même se demander si les organes injectés ne renfermaient pas des anticorps, susceptibles de conférer à la souris un certain degré d'immunité passive vis-à-vis du pneumocoque, ce qui fausserait complètement les expériences.

D'ailleurs, le fait de ne pouvoir immuniser contre un microbe une espèce animale très sensible, n'a rien d'exceptionnel. M. Nicolle a bien voulu nous communiquer le résultat d'expériences inédites, excessivement nombreuses, faites par lui et Adil-bey, en 1900, sur la bactérie du choléra des poules. On sait que le pigeon est très sensible à ce germe; l'échantillon étudié le tuait, en moins de vingt-quatre heures, à la dose de 10^{-7} cent. cube. Un gramme de microbes, cultivés sur gélose et tués par l'autolyse chloroformique ou par le liquide de Gram, est admirablement supporté, mais ne vaccine pas le pigeon contre 10^{-6} cent. cube : cette faible dose tue les vaccinés, comme les témoins, en moins de vingt-quatre heures.

Quoi qu'il en soit, nos résultats, presque totalement négatifs, nous ont détournée de poursuivre les expériences sur la souris.

2° EXPÉRIENCES SUR LE LAPIN

Nous avons employé des animaux de 1 k. 800 à 2 kilogrammes en moyenne.

Immunisation. — Le **vaccin** est préparé absolument de la même façon que pour la souris; cependant, ici, 1 cent. cube d'émulsion correspond à 5 (et non à 10) cent. cubes de culture.

La **dose** injectée a toujours été de 10 cent. cubes de culture (2 cent. cubes d'émulsion par conséquent).

Mais le **mode d'administration** a varié : nous avons, dans nos premiers essais, injecté cette dose en une seule fois. Les animaux ont présenté une émaciation marquée; près de la moitié

d'entre eux étaient en trop mauvais état pour qu'on pût les éprouver en temps voulu. Nous avons rapidement abandonné ce procédé. Dans toutes les expériences rapportées ici, les lapins ont reçu la dose totale de 10 cent. cubes en deux injections, de 5 cent. cubes chacune, à cinq jours d'intervalle.

L'immunisation a été faite par **voie intramusculaire** (presque toujours) **ou intraveineuse** (rarement).

Nous avons étudié les propriétés vaccinantes des **cinq échantillons** A, H, 286 L, F et 312 O dont on a vu au chapitre précédent les diverses caractéristiques (origine, virulence, etc.).

Rappelons à ce propos que les pneumocoques H, 286 L, F et 312 O meurent par chauffage d'une demi-heure à 55°, mais que la race A résiste à ce traitement. Pour les quatre premiers échantillons, notre vaccin a donc consisté en *microbes tués par la chaleur*; pour le dernier, nous avons opéré avec des *microbes chauffés, mais vivants.*

Tableau VI. — **Effets de la vaccination chez les lapins.**

SIGNALEMENT de l'échantillon-vaccin	NOMBRE DE LAPINS ayant succombé.	NOMBRE DE LAPINS supprimés pour émaciation.	NOMBRE DE LAPINS ayant bien supporté la vaccination.
A	0	2	13
H	0	0	14
286 L	0	0	12
F	0	2	13
312 O	5	2	30

Il est intéressant de faire connaître la **manière dont les lapins ont supporté l'immunisation.** Un certain degré d'amaigrissement est presque constant. Généralement léger et transitoire, il peut atteindre, à titre exceptionnel, jusqu'au tiers du poids de l'animal; il aboutit alors, le plus souvent, à la mort. Sauf les cas, très rares, d'une infection surajoutée, l'émaciation et la mort doivent être rapportées à la *toxine pneumococcique*. La diarrhée, qui est fréquente, reconnaît la même étiologie. Nous n'avons jamais observé de paralysies.

Sur 93 lapins immunisés par nous, 82 ont fort bien supporté

le traitement; 6 (= 6,4 %) ont été supprimés pour cause d'émaciation marquée; 5 (= 5,3 %) sont morts, la plupart de cachexie (voir tableau 6). Nous avons donc perdu en tout 11 animaux (= 12 % environ). Les pertes auraient, croyons-nous, été beaucoup plus considérables si l'immunisation avait été faite en une seule injection. Quant à la part qui revient à chaque échantillon, dans ces pertes, on voit que si le pneumocoque le plus virulent (312 O) s'est montré aussi le plus toxique, le moins virulent (A) n'est pas dépourvu de toxicité; il est vrai que ce germe a été employé vivant.

Épreuve. — Une série d'expériences préliminaires faites sur des lapins immunisés depuis cinq, dix, quinze et vingt jours, nous ont permis de déterminer le **moment** le plus favorable pour l'épreuve. Celle-ci aura lieu huit jours après la dernière injection vaccinante.

Les cultures sont inoculées **sous la peau** du ventre.

L'épreuve a été faite avec les 6 **pneumocoques** 312 O, F, L2, 286 L, L1 et C5. L'expérience a porté essentiellement sur 60 lapins répartis en 5 lots correspondant respectivement aux 5 échantillons employés pour l'immunisation. Dans chaque lot, les animaux étaient divisés en 6 groupes de 2, correspondant respectivement aux 6 pneumocoques choisis pour l'épreuve. Les témoins étaient en nombre généralement égal à celui des vaccinés.

Les **doses** inoculées sont de 10^{-3} cent. cube pour les races 312 O, F et L2; 10^{-2} cent. cube pour les trois autres. La virulence étant variable d'un échantillon à l'autre, il eût été irrationnel d'injecter la même quantité dans tous les cas. Les nombres choisis sont-ils un multiple constant de la dose minima mortelle? Au moment où nous faisions ces expériences, le pneumocoque 312 O tuait le lapin à 10^{-3} cent. cube; 10^{-3} correspond donc à 1.000.000 de doses mortelles. Cela reviendrait, pour l'échantillon 286 L, à inoculer 100 cent. cubes. Or, il a été expérimentalement démontré, au laboratoire de M. Nicolle, qu'il est beaucoup plus facile d'immuniser contre un petit nombre de germes très actifs que vis-à-vis d'une *masse* considérable de microbes relativement peu virulents. De par la nature même d'expériences portant, à dessein, sur des germes de virulences

différentes, il était donc impossible d'opérer dans des conditions rigoureusement comparables. Les doses que nous avons choisies, nécessairement d'une façon un peu arbitraire, nous ont paru les mieux appropriées à la nature de nos recherches.

Les animaux ont été conservés au moins sept jours après l'épreuve. Ce délai écoulé, ceux qui ne présentaient plus, ou qui n'avaient jamais présenté aucun symptôme morbide, local ou général, ont été supprimés. Nous avons gardé les autres jusqu'à leur guérison ou leur mort. La guérison est caractérisée par l'augmentation régulière du poids de l'animal, et la réparation plus ou moins parfaite de la lésion locale.

D'après **l'évolution**, on peut classer les lapins vaccinés de la façon suivante :

1. Mort dans les mêmes délais que les témoins.
2. Mort avec retard.
3. Mort d'infection surajoutée (très rare).
4. Survie avec lésion locale et émaciation transitoire.
5. Survie avec lésion locale sans émaciation notable.
6. Survie sans lésion locale ni émaciation notable.

Quand on injecte, sous la peau du ventre d'un lapin, une culture de pneumocoque, il se peut qu'il ne s'ensuive aucune **lésion locale**, soit que l'échantillon inoculé n'ait aucune activité chez cet animal, soit, au contraire, qu'il s'agisse de germes très virulents déterminant d'emblée une infection générale rapidement mortelle. Plus souvent, on voit apparaître une lésion intéressant à la fois l'épiderme, le derme et le tissu cellulaire sous-cutané. Dans les formes types, après vingt-quatre heures, la peau présente, au point d'inoculation, une rougeur plus ou moins étendue, au centre de laquelle apparaît une tache de teinte violacée mêlée parfois de tons verdâtres; il s'agit d'une véritable escarre, à dimensions atteignant, au maximum, celles d'une pièce de 5 francs, à bords nettement limités par une zone de coloration plus foncée. La peau nécrosée est généralement un peu luisante ; un léger frottement suffit souvent à détacher l'épiderme. En même temps se forme un œdème, mou et tremblotant, — cas habituel quand la mort survient en trente à

quarante-huit heures —, plus ferme, plus étalé, pouvant s'étendre à toute la paroi abdominale, dans le cas d'une survie plus longue. L'animal résiste-t-il assez longtemps, l'œdème se limite et devient plus dur ; l'escarre se dessèche, ses bords se détachent, et elle finit par tomber, découvrant un ulcus plus ou moins profond, recouvert d'un exsudat fibrino-leucocytaire, de coloration verdâtre ; l'ulcus peut se réparer dans la suite si le sujet guérit.

Chez les animaux qui ont servi de *témoins* dans nos expériences d'immunité active, nous n'avons guère pu suivre que la première phase de la lésion, la mort survenant généralement avant la dessiccation de l'escarre. — Les lapins *vaccinés qui succombent* dans les mêmes délais que les témoins n'ont presenté aucune particularité les distinguant de ceux-ci. La mort est-elle retardée par une immunité incomplète, la lésion locale continue à progresser. — Chez les lapins *vaccinés qui résistent* à l'épreuve, ou bien il n'y a pas la moindre lésion, ni cutanée ni sous-cutanée ; c'est le cas le plus fréquent ; ou bien il y a une lésion : soit un œdème fugace, se terminant par résolution pure et simple ; soit un empâtement accompagné d'une escarre évoluant plus ou moins rapidement vers la guérison.

Les **symptômes généraux** que présentent les *témoins* sont d'intensité variable. Ils peuvent manquer complètement : les animaux semblent en bonne santé, ils mangent comme d'habitude, puis, subitement, ils tombent sur le côté, font quelques mouvements convulsifs, et meurent. Plus souvent, les lapins restent immobiles et ne touchent pas à leurs aliments ; une diarrhée glaireuse est fréquente ; on observe parfois des épistaxis. L'amaigrissement, à peu près constant, peut être très léger si la mort est précoce. — Les *immunisés qui succombent* à l'épreuve se comportent comme les témoins. La perte de poids est plus marquée si la mort est retardée. — Quant aux *vaccinés qui résistent* à l'épreuve, les uns continuent à engraisser régulièrement, et n'offrent aucune manifestation morbide, si faible soit-elle. Les autres, après une période d'amaigrissement, reviennent plus ou moins vite à leur état antérieur. La perte de poids est toujours minime quand il y a absence de lésion locale. Nous n'avons jamais observé de diarrhée.

A **l'autopsie** des *témoins* on trouve, sous la peau, au point

d'inoculation, un exsudat verdâtre, mou et infiltré de sérosité (cas de mort rapide) ou d'une consistance plus ferme (cas de survie relativement longue) ; les pneumocoques y abondent en général Les viscères sont congestionnés. Il est classique de dire que la rate est hypertrophiée dans la septicémie pneumococcique ; le fait est cependant loin d'être constant, et l'on rencontre fréquemment des rates de dimensions égales ou inférieures à la normale ; la durée plus ou moins longue de la maladie, la virulence plus ou moins grande de l'échantillon inoculé ne semblent pas devoir être mises en cause pour expliquer ces irrégularités. Sur les frottis de sang des cadavres, on trouve toujours des pneumocoques. — Il en est généralement de même chez les *vaccinés qui succombent* à l'épreuve. Toutefois, quand la mort est relativement tardive (du quatrième au septième jour) les germes se font rares dans le sang et peuvent ne pas être visibles sur les frottis ; mais l'ensemencement du sang du cœur donne invariablement une culture positive. — Quelques lapins vaccinés, sortis victorieusement de l'épreuve, mais ayant présenté une lésion locale, ont été *sacrifiés* au bout d'un temps variant de douze à vingt-deux jours. Les frottis et les cultures du sang et de la rate ont tous été négatifs ; sous la peau, au niveau du point d'inoculation, nous avons constaté, dans certains cas, la présence de quelques pneumocoques.

Exposé et discussion des résultats. — Nos expériences portent, on s'en souvient, sur cinq lots formés chacun de douze lapins groupés par couples. Étudions successivement chacun de ces lots (voir tableau 7).

Les LAPINS A (c'est-à-dire immunisés avec le pneumocoque A) ont tous succombé à l'épreuve. Ils ne se sont distingués en rien des témoins ; il n'y a pas même eu de retard dans la mort. On peut donc dire que, vis-à-vis des six échantillons employés pour l'épreuve, le pouvoir vaccinant du pneumocoque A est nul.

Dans le lot suivant (LAPINS II) le progrès est sensible. Par rapport à deux échantillons, le vaccin II a incontestablement fait preuve de propriétés immunisantes ; mais son action est incomplète (mort d'un seul des deux lapins éprouvés avec F, lésion locale et survie chez l'autre ; — lésion locale et survie chez les deux lapins du groupe L 1).

Les lapins 286 L se divisent nettement en deux catégories. Les animaux éprouvés avec les pneumocoques 312 O, F et L 2 se sont comportés comme les témoins ; leur immunité était nulle. Ceux éprouvés avec 286 L, L 1 et C 5 ont présenté l'immunité totale (aucun symptôme morbide, général ou local).

Chez les lapins F, immunité totale vis-à-vis des échantillons 312 O, F et L 2, incomplète vis-à-vis de L 1 ; nulle dans les deux autres groupes.

Tableau VII. — **Immunité active chez le lapin.**

Échantillons vaccins	Échantillons d'épreuve					
	312 O	F	L 2	286 L	L 1	C 5
A	—	—	—	—	—	—
	—	—	—	—	—	—
H	—	—	—	—	+ Lés. loc.	—
	—	+ Lés. loc.	—	—	+ Lés. loc.	—
286 L	—	—	—	+	+	+
	—	—	—	+	+	+
F	+	+	+	—	—	—
	+	+	+	—	+ Lés. loc.	—
312 O	+	+	+	+ Lés. loc.	—	...
	+	+	+	+	+ Lés. loc.	+

+ : Survie sans lésion locale.
+ Lés. loc. : Survie avec lésion locale.
— : Mort dans les mêmes délais que les témoins.
... : Mort avec retard.
Chaque signe correspond à un lapin.

Le lot 312 O est particulièrement intéressant. Dans aucun groupe l'immunité n'a été nulle. Il n'y a eu que des différences de degrés : immunité totale ou presque totale (groupes 312 O, F, L 2 et 286 L), incomplète (groupe L 1 et C 5).

Un premier fait ressort avec évidence de ces expériences : le vaccin A ne confère l'immunité contre aucun des échantillons employés pour l'épreuve ; tous les autres vaccins, au contraire, protègent plus ou moins complètement contre un nombre plus

ou moins grand de ces échantillons. Or, le pneumocoque A se distingue des autres races utilisées pour la vaccination par un caractère de première importance : il est à peu près avirulent (« à la limite » pour la souris, qu'il ne tue qu'inconstamment au centimètre cube, complètement avirulent pour le lapin et le cobaye). Rappelons que le vaccin A a été injecté vivant, puisqu'il a résisté au chauffage, et que, par conséquent, aucune altération profonde de sa substance n'est venue diminuer ses propriétés immunisantes possibles.

Le nombre de nos expériences est trop restreint pour qu'il nous soit permis d'en inférer que le vaccin A est totalement dépourvu de pouvoir immunisant vis-à-vis de tout pneumocoque quel qu'il soit. Nos résultats, constamment négatifs, permettent cependant d'affirmer que ce pouvoir, s'il existe, est limité à un très petit nombre de races. D'une façon plus générale, nous pensons être en droit d'affirmer que, POUR VACCINER CONTRE LE PNEUMOCOQUE, IL NE FAUT PAS AVOIR RECOURS A UN GERME AVIRULENT, MÊME VIVANT.

Les échantillons H. 286 L. F et 312 O ont tous fait preuve de propriétés vaccinantes. Aucun d'entre eux, on s'en souvient, n'avait résisté au chauffage. IL EST DONC POSSIBLE D'IMMUNISER LE LAPIN AVEC DES PNEUMOCOQUES MORTS.

Les résultats auraient-ils été meilleurs si les microbes avaient été injectés vivants ? Mais les échantillons en cause sont virulents pour le lapin ; or, on verra plus loin que la vaccination du lapin avec des germes vivants et virulents nous a donné des échecs constants, et que ce procédé est à rejeter. L'on n'a donc pas le choix : si l'on a recours à des pneumocoques virulents, il faut les tuer avant de les injecter. D'autre part, nous savons qu'un pneumocoque avirulent, même vivant, ne vaccine pas. POUR IMMUNISER LE LAPIN CONTRE LE PNEUMOCOQUE IL FAUT DONC EMPLOYER DES GERMES MORTS, D'ESSENCE VIRULENTE.

Les propriétés immunisantes doivent être étudiées à deux points de vue bien distincts. D'une part, le pouvoir antigène d'un vaccin peut être plus ou moins *intense* vis-à-vis d'un échantillon déterminé ; d'autre part, le domaine immunisant de ce vaccin peut être plus ou moins *étendu* selon le nombre d'échantillons à l'égard desquels il manifeste ce pouvoir antigène. Un

vaccin confère-t-il, par exemple, une immunité complète à des animaux éprouvés avec un pneumocoque donné, vis-à-vis de ce pneumocoque le pouvoir antigène du vaccin sera dit intense ; mais les sujets immunisés avec ce même vaccin et éprouvés avec d'autres races, succombent-ils, nous dirons que le domaine de ce vaccin est peu étendu. Il va de soi, d'ailleurs, que le champ d'action peut être « étendu » à un grand nombre d'échantillons, le pouvoir antigène étant d'intensité différente à l'égard de chacun d'entre eux ; toutes les combinaisons sont possibles.

Considérons, d'abord, chez les quatre vaccins H, 286 L, F et 312 O, ce qui se rapporte à L'ÉTENDUE de leur domaine. Négligeons, par conséquent, pour l'instant, toutes les différences d'intensité du pouvoir antigène, et classons comme positifs, à un même degré, tous les cas où des propriétés immunisantes, faibles ou fortes, nous sont apparues (voir tableau 8).

TABLEAU VIII. — **Antigènes élémentaires.**

ÉCHANTILLONS VACCINS	ÉCHANTILLONS D'ÉPREUVE					
	312 O	F	L 2	286 L	L 1	C 5
A	–	—	—	—	–	—
H	—	+	–	–	+	–
286 L	–	—	—	+	+	+
F	+	+	+	—	+	—
312 O	+	+	+	+	+	+

On voit que :

Le domaine du pneumocoque H s'étend à deux échantillons (F et L 1).

Le domaine du pneumocoque 286 L s'étend à trois échantillons (286 L, L 1, C 5).

Le domaine du pneumocoque F s'étend à quatre échantillons (312 O, F, L 2, L 1).

Le domaine du pneumocoque 312 O s'étend à six échantillons (tous les échantillons étudiés).

Analysons un de ces cas, celui du vaccin F par exemple. Il immunise contre lui-même ; de plus, il vaccine contre 312 O,

L 2, L 1, tout comme (au degré près) 312 O, L 2 et L 1 auraient vacciné contre eux-mêmes. Tout se passe comme si F était formé d'un assemblage d'*éléments*, qui seraient doués de propriétés *antigènes*, et qui correspondraient aux divers échantillons contre lesquels le vaccin F immunise. C'est ce que nous appellerons les *antigènes élémentaires*.

Un pneumocoque nous apparaît comme une véritable mosaïque d'antigènes élémentaires. Leur nombre diffère, semble-t-il, d'une race à l'autre, et ils se groupent de la façon la plus déconcertante. On aurait pu croire, *a priori*, que tout pneumocoque à domaine d'une certaine étendue posséderait tous les antigènes d'un germe à domaine moindre, et, en plus, des antigènes nouveaux. Nos expériences montrent qu'il n'en est rien. Le vaccin 286 L, par exemple, est plus riche en antigènes que le vaccin H, mais il a, en moins, l'antigène F. De même, le vaccin F, plus riche que 286 L, a en moins 286 L et C 5. Seul le domaine du vaccin 312 O couvre ceux de toutes les autres races étudiées ici. — En résumé, nos vaccins ne se distinguent pas les uns des autres uniquement par le nombre variable de leurs antigènes élémentaires; à des différences *quantitatives* s'ajoutent des différences *qualitatives*. Ce qui caractérise une mosaïque, c'est à la fois le *nombre* et la *nature* de ses morceaux constituants.

Mais c'est aussi leurs *rapports* réciproques. Et en effet, non seulement le nombre d'antigènes contenus dans un pneumocoque peut être plus ou moins grand, non seulement leur nature peut être différente, mais encore il semble que chacun d'eux puisse y occuper une place plus ou moins importante, de telle sorte qu'il y aurait des antigènes *dominants* et des antigènes *accessoires*. On arrive à cette notion en considérant l'intensité variable du pouvoir immunisant de nos vaccins vis-à-vis des divers échantillons d'épreuve. (Nous avions momentanément, et pour simplifier, laissé de côté ces différences; il est nécessaire maintenant d'y revenir.) — C'est ainsi (voir tableau 7, page 41) que le pneumocoque 312 O confère une immunité beaucoup plus complète contre F, L 2 et 286 L qu'à l'égard de L 1 et C 5. Les antigènes F, L 2 et 286 L semblent donc entrer pour une plus large part dans la constitution du pneumocoque 312 O que les antigènes L 1 et C 5. Nous pensons qu'il s'agit là d'un fait général, et

QU'UN PNEUMOCOQUE A DOMAINE MÊME TRÈS ÉTENDU VACCINERA TOUJOURS MIEUX CONTRE CERTAINES RACES QUE CONTRE D'AUTRES. Son pouvoir antigène vis-à-vis d'une race donnée peut, quelquefois, être moindre que celui d'un pneumocoque à domaine plus restreint que le sien. 286 L, par exemple, donne une immunité complète à l'égard de L 1 et de C 5, alors que l'immunité conférée par 312 O est beaucoup plus incertaine; L 1 et C 5, antigènes élémentaires accessoires de 312 O, sont des antigènes dominants chez 286 L.

TABLEAU IX. — **Virulence pour la souris, le lapin et le cobaye des 5 pneumocoques employés comme vaccins.**

SIGNALEMENT de l'échantillon.	DOSE MORTELLE pour la souris.	DOSE MORTELLE pour le lapin.	DOSE MORTELLE pour le cobaye.
A	1 cent. cube (irrégulièrement)	Avirulent.	Avirulent.
H	10^{-2} cent. cube.	Avirulent.	Avirulent.
286 L	10^{-1} cent. cube.	10^{-4} cent. cube.	Avirulent.
F	10^{-7} cent. cube.	10^{-5} cent. cube.	Avirulent.
312 O	10^{-7} cent. cube.	10^{-9} cent. cube.	1 cent. cube.

Rappelons que, selon plusieurs auteurs, les pneumocoques formeraient un petit nombre de GROUPES; pour tous les individus d'un même groupe, le domaine serait identique. Nos expériences ont été faites sur une trop petite échelle pour qu'il nous soit permis de réfuter péremptoirement cette assertion. Toutefois, il y a lieu de remarquer que, dans aucun des cas étudiés, nous n'avons trouvé, chez deux échantillons, le même assemblage d'antigènes élémentaires. Le hasard qui n'aurait mis en nos mains que des pneumocoques de groupes différents serait tout au moins singulier. Et puis, comment délimiter ces groupes? 312 O immunise contre 286 L, ces deux germes feraient donc partie d'un même groupe; mais 286 L n'immunise pas contre 312 O.....

Un pneumocoque étant donné, est-il possible de prévoir, approximativement, quelles seront ses propriétés antigènes?

Nous avons déjà partiellement répondu à cette question en montrant qu'un pneumocoque avirulent est dépourvu, plus ou moins complètement, de propriétés antigènes.

Il nous est possible maintenant de généraliser davantage, et nous dirons que LE POUVOIR ANTIGÈNE D'UN PNEUMOCOQUE EST HABITUELLEMENT D'AUTANT PLUS GRAND QUE SA VIRULENCE EST PLUS GRANDE.

Considérons, en effet, nos cinq vaccins. Nous les avons rangés, dans le tableau 9, par ordre de virulence croissante; or cet ordre se confond avec celui du tableau 8 (voir page 43), où c'est le nombre d'antigènes élémentaires qui a déterminé le classement.

Seuls les échantillons virulents pour le lapin ont présenté un pouvoir antigène intense.

Le pouvoir antigène le plus étendu s'est rencontré chez le seul de nos échantillons qui fût virulent pour le cobaye.

3° CONCLUSIONS

L'immunité antipneumococcique active dépend essentiellement de deux facteurs : l'animal immunisé et le pneumocoque immunisant.

L'animal immunisé. — Ce qui démontre l'influence de l'espèce animale, c'est qu'on ne peut immuniser la souris.

Pour qu'il y ait immunité, il faut : 1° que le microbe immunisant soit pourvu de propriétés antigènes (agglutinogènes et lysogènes), susceptibles de provoquer la formation des anticorps correspondants (agglutinines et lysines); 2° que l'animal immunisé soit capable de répondre à cet appel en fabriquant ces anticorps.

Aux propriétés ANTIGÈNES du microbe s'opposent donc ce que nous nommons, au laboratoire de M. Nicolle, les propriétés « ANTIPOÏÉTIQUES » de l'animal.

A L'ÉGARD DU PNEUMOCOQUE, LA SOURIS NOUS APPARAIT COMME ÉTANT DÉPOURVUE DE PROPRIÉTÉS ANTIPOÏÉTIQUES.

Le pneumocoque immunisant. — (Tout ce qui va suivre se rapporte exclusivement à l'immunité active *chez le lapin*.)

1. Il est impossible de vacciner avec un pneumocoque vivant virulent.

2. Un pneumocoque avirulent, même vivant, est pratiquement dépourvu de propriétés antigènes. Il faut donc vacciner avec un pneumocoque virulent mort.

3. Un pneumocoque virulent a un domaine numériquement variable. Deux pneumocoques virulents peuvent avoir des domaines qualitativement différents.

4. Il y a des pneumocoques a domaine très étendu, mais ils immunisent toujours mieux contre certaines races que contre d'autres.

5. A une grande virulence correspond habituellement un pouvoir antigène étendu.

CHAPITRE IV

IMMUNITÉ PASSIVE.

I° PRÉPARATION DES SÉRUMS

Les échantillons choisis pour cette étude sont les pneumocoques A, H, 286 O, 286 S, 286 L, 286 C, F, 312 O et 312 C.

Nous avons préparé des sérums chez le mouton, le lapin et le cobaye.

HYPERIMMUNISATION DES MOUTONS

(Rappelons que nous sommes redevable, de tout ce qui concerne la préparation des sérums ovins, à notre collaborateur et ami M. Truche.)

Les moutons n'ont été immunisés qu'avec des **pneumocoques vivants**. Des cultures de vingt-quatre heures, en milieu T, étaient centrifugées avec l'appareil de Jouan, et le culot était ensuite émulsionné dans de l'eau physiologique. — Deux de nos moutons ont été immunisés simultanément avec deux races différentes (286 L et F) : dans ce cas, chacune des deux cultures a été centrifugée séparément; puis les émulsions ont été réunies, et le mélange injecté aux moutons.

Les émulsions sont inoculées **sous la peau**, en arrière des coudes, alternativement à droite et à gauche.

Voici les détails des immunisations et la façon dont les moutons se sont comportés au cours du traitement.

Pneumocoque A (Mouton de 50 kil.). — On commence par injecter le culot de 20 cent. cubes, et l'on va jusqu'au culot de 800 cent. cubes en une fois. Peu de réaction locale ou générale. *Saignées* après injections globales de 845, 3.475, et 11.275 cent. cubes (culots).

Pneumocoque H. (Mouton de 40 kil.). — On débute par le culot de 20 cent. cubes, et l'on va jusqu'au culot de 1.200 cent. cubes en une fois. D'abord, peu de réaction. Première *saignée* (seule utilisée) après injection globale de 1.425 cent. cubes (culots). Lorsqu'on arrive à une masse globale de 5.625 cent. cubes, fièvre, dyspnée, décubitus, anorexie. On fait une saignée (pneumocoques dans le sang). Mort peu après; (péricardite et pleurésie; pneumocoques partout).

Pneumocoque 286 O (Premier mouton, 68 kil.). — On débute par le culot de 20 cent. cubes, et l'on va jusqu'au culot de 600 cent. cubes d'un coup. Réactions thermiques marquées; œdème au niveau de la précédente injection (phénomène de Frasey) (1) observé une fois. — Quand on arrive à 600 cent. cubes, paralysie des membres antérieurs, dyspnée, mort (péritonite et pleurésie; pneumocoques partout).

(Deuxième mouton, 34 kil.). — On débute par le culot de 20 cent. cubes, et l'on va jusqu'au culot de 600 en une fois. *Saignée* après injection globale de 1.400 cent. cubes (culots). A quelque temps de là, mort en deux jours sans signes spéciaux; (foie et reins pâles; rares pneumocoques dans le foie et la rate).

Pneumocoque 286 S (Premier mouton, 33 kil.). — On débute par le culot de 20 cent. cubes, et l'on va jusqu'au culot de 160 en une fois. A ce moment, paralysie des membres antérieurs, qui s'améliore ensuite. On injecte le culot de 50 cent. cubes : paralysie totale; mort sans pneumocoques dans l'organisme.

(Deuxième mouton, 30 kil.). — On débute par le culot de 20 cent. cubes, et l'on va jusqu'au culot de 500 cent. cubes en une fois. *Saignée* après injection globale de 1.400 cent. cubes (culots). Puis paralysie des membres antérieurs et cachexie. On cesse l'immunisation.

Pneumocoque 286 L (Mouton de 33 kil.). — On débute par le culot de 20 cent. cubes, et l'on va jusqu'au culot de 600 cent. cubes en une fois. *Saignées* après injections globales de 1.470 et 5.000 cent. cubes (culots). Puis paralysie des pattes antérieures, dyspnée, mort (lésions rénales; rares pneumocoques dans la rate).

(1) Frasey (*Comptes rendus de la Société de Biologie*, 16 mars 1912) : Sur une réaction spéciale d'hypersensibilité observée chez un cheval immunisé contre le pneumocoque.

Pneumocoque 286 C (Mouton de 29 kil.). — On débute par le culot de 20 cent. cubes, et l'on va jusqu'au culot de 400 cent. cubes en une fois. *Saignée* après injection globale de 1.470 cent. cubes. Puis œdèmes marqués, fièvre, cachexie, mort (pas de pneumocoques dans l'organisme).

Pneumocoques F et 286 L (Premier mouton, 33 kil. 500). — On débute par les culots de 10 cent. cubes de chacun des deux échantillons, et l'on va jusqu'aux culots de 150 cent. cubes en une fois. *Saignées* après injections globales de 750 et de 1.500 cent. cubes (culots) de chacun des deux échantillons. — Peu de réaction locale ou générale : mais, au cours du traitement, apparition de paralysie des pattes antérieures, portant surtout sur les extenseurs des phalanges, et obligeant l'animal à marcher sur ses genoux.

Deuxième mouton (34 kil.). — L'immunisation a été conduite absolument comme pour le mouton précédent. Pas de paralysie. Réaction locale et générale peu marquée au début, nulle dans la suite.

Pneumocoque 312 O (Mouton de 34 kil.). — On débute par le culot de 20 cent. cubes et l'on va jusqu'au culot de 200 cent. cubes d'un coup. Dès la première injection, fièvre et boiterie des membres antérieurs. Quand on arrive à l'injection globale de 500 cent. cubes (culots), œdème énorme occupant toute la face inférieure du tronc ; dyspnée et décubitus. La lésion locale aboutit à des escarres qui s'éliminent puis se réparent. L'immunisation, interrompue pendant un mois, est reprise, et se poursuit sans incidents. *Saignées* après injections globales de 1.500 et 3.000 cent. cubes.

Pneumocoque 312 C (Mouton de 35 kil.). — On débute par le culot de 20 cent. cubes et l'on va jusqu'au culot de 200 cent. cubes en une fois. Œdèmes fugaces et relativement peu intenses. Réaction thermique et abattement marqué lors des première et treizième injections. *Saignées* après injections globales de 1.500 et de 3.000 cent. cubes.

Comme on voit d'après les expériences que nous venons de résumer, les moutons se sont immunisés plus ou moins facile-

ment contre de fortes doses de pneumocoques virulents. Quelquefois la *résistance antimicrobienne* est devenue complète; (survie : 5 cas; ou mort sans pneumocoques : 2 cas). Ailleurs, elle est demeurée insuffisante à un moment donné (mort avec de rares germes viscéraux : 2 cas). Dans un dernier ordre de cas elle a disparu plus ou moins tôt (mort avec lésions des séreuses et septicémie : 2 cas). — Enfin les moutons se sont mal immunisés contre la *toxine* à laquelle il convient de rapporter les paralysies, les lésions rénales, et l'état cachectique communément observés.

HYPERIMMUNISATION DES LAPINS

Nous avons employé un seul échantillon : le pneumocoque 312 O.

Les animaux immunisés sont des lapins de 1 kil. 700 à 2 kil. 700.

Hyperimmunisation avec des cultures vivantes. — Dans une première série d'expériences, nous avons cherché à obtenir un sérum en injectant aux lapins des cultures de moins en moins diluées de pneumocoques vivants. Mais comme notre échantillon tue le lapin « à l'unité », il nous a fallu d'abord conférer un certain degré d'immunité à l'aide de microbes morts. Nous avons donc injecté à nos lapins une dose de **culture chauffée** amplement suffisante pour vacciner contre 10^{-4} cent. cube de culture vivante; cette dose a varié, dans le cours de nos expériences, entre 5 et 10 cent. cubes (culots). Le vaccin a été préparé absolument de la même façon que pour nos recherches sur l'immunité active, et injecté dans les muscles de la cuisse.

La première inoculation de **pneumocoques vivants** (10^{-4} cent. cube) a été faite sous la peau de l'abdomen, et n'a jamais donné lieu à la moindre réaction locale. Nous avons injecté ensuite, dans les muscles, des dilutions généralement de 10 en 10 fois moins fortes de manière à arriver en fin de compte à la culture telle quelle, c'est-à-dire non diluée.

Les inoculations ont, dans nos premiers essais, été faites tous les cinq jours. Dans la suite, nous les avons espacées de huit, puis de quinze jours. Les effets n'ont pas été meilleurs.

Des vingt lapins traités, un seul a résisté au traitement et est arrivé à supporter successivement 10^{-4}, 10^{-2}, 10^{-2}, 10^{-1}, 1/2, 10^{-2}, 10^{-1}, 10^{-1}, 1/2 cent. cube de culture vivante. Encore a-t-il fallu trois mois pour arriver à ce médiocre résultat. L'animal est mort accidentellement à la suite d'une saignée d'essai. Disons, pour n'y plus revenir, que son sérum, titré sur le lapin et la souris, était dénué de toute activité.

Quatre lapins se sont cachectisés dès le début du traitement qui n'a pu, par conséquent, être poursuivi.

Trois animaux sont morts après avoir reçu respectivement 10^{-4}, 10^{-2} et 1 cent. cube de culture; à l'autopsie, aucune lésion viscérale; émaciation marquée chez les deux premiers, très modérée chez le dernier. L'ensemencement du sang du cœur a donné, dans les trois cas, des résultats négatifs.

Cinq lapins sont morts de septicémie pneumococcique; quatre d'entre eux venaient de recevoir 10^{-2} cent. cube, le cinquième 1/2 cent. cube de culture.

Enfin sept lapins ont succombé à des infections surajoutées dues à des microbes variés, en particulier au bacille de Schmorl et à la Pasteurella.

En résumé, si nous laissons de côté ce dernier groupe, nos lapins peuvent se ranger en deux catégories. Les uns n'ont acquis qu'une *résistance antimicrobienne* faible, et ont succombé à la septicémie pneumococcique, plus ou moins rapidement. Tous les autres (sauf le premier de notre liste) se sont mal immunisés contre la *toxine* à laquelle il faut rapporter l'état cachectique ou la mort sans germes observés dans plus d'un tiers des cas.

On voit combien il est difficile d'immuniser le lapin avec des dilutions d'un pneumocoque vivant et virulent. Cependant, ce procédé fut employé jadis par Emmerich qui serait arrivé à immuniser contre l'injection intraveineuse de 20 cent. cubes de culture vivante. L'échantillon qu'a employé cet auteur devait certainement être beaucoup moins virulent et moins toxique que le nôtre. D'ailleurs, Pio Foa, qui a repris ses expériences, n'a jamais pu les réussir : ou la première dilution injectée était insuffisante pour conférer l'immunité vis-à-vis d'une culture moins diluée, ou elle tuait d'emblée l'animal.

Hyperimmunisation avec des cultures chauffées. — Etant donnés les résultats déplorables obtenus avec les microbes vivants, nous avons cherché à hyperimmuniser en nous servant exclusivement de cultures chauffées.

Le **vaccin** a été préparé de la même façon que pour nos expériences d'immunité active (culots chauffés une demi-heure à 55°) et injecté dans les veines de l'oreille.

La méthode n'a été essayée que sur un seul lapin. Voici les détails du traitement et la manière dont s'est comporté l'animal.

Lapin de 2 kil. 620. — Injecté en moyenne tous les dix jours. On débute par le culot de 5 cent. cubes, et l'on va jusqu'au culot de 20 cent. cubes en une fois. *Première saignée* (à la veine de l'oreille) après injection globale de 35 cent. cubes (culots). *Deuxième saignée* (à blanc, à la carotide) après injection globale de 100 cent. cubes (culots). La durée du traitement a été de trois mois. Aucun incident, sauf, de temps à autre, une diarrhée peu marquée. Pas d'émaciation; à la fin de l'expérience, l'animal pesait 3 kil. 200. — C'est le sérum de ce lapin qui constitue le sérum 312 O (lap.) dont il sera question dans la suite.

HYPERIMMUNISATION DES COBAYES

Toutes nos expériences ont été faites avec le pneumocoque 312 C (Rappelons que ce pneumocoque « de passage » tue le cobaye à 10^{-5}, occasionnellement même à 10^{-6} cent. cube).

Nous avons employé des cobayes mâles, pesant entre 550 et 900 grammes.

Hyperimmunisation avec des cultures vivantes. — Ici encore nous avons essayé d'injecter des dilutions de **cultures vivantes**, après une première étape d'immunisation par des **microbes morts** (culots de 10 cent. cubes, chauffés une demi-heure à 55° et injectés en deux fois).

Onze cobayes ont été traités de la sorte : deux sont morts cachectiques avant d'avoir reçu de microbes vivants ; un autre a été supprimé à cause de son mauvais état. Deux cobayes sont morts de septicémie pneumococcique après avoir reçu respectivement 10^{-4} et 10^{-3} cent. cube de culture vivante.

Chez aucun de nos lapins, traités de façon identique et éprou-

vés avec les mêmes doses d'un germe de virulence semblable l'immunité antimicrobienne ne s'était montrée à ce point insuffisante; l'inoculation de 10^{-4} ou de 10^{-3} cent. cube de culture n'a jamais déterminé, en effet, chez nos lapins vaccinés, la mort par septicémie. Le cobaye, malgré sa grande résistance naturelle à l'infection pneumococcique, acquerrait donc l'immunité plus difficilement que le lapin.

Quoi qu'il en soit, ces résultats peu encourageants nous ont amenée à renoncer aux dilutions de cultures vivantes pour le cobaye comme pour le lapin, et à poursuivre l'immunisation de nos six cobayes survivants exclusivement avec des culots de cultures chauffés.

Hyperimmunisation avec des cultures chauffées. — Les injections ont été faites dans les muscles des pattes postérieures.

On a débuté par le culot de 5 cent. cubes et l'on est allé jusqu'au culot de 20 cent. cubes en une fois. *Saignée* après injection globale de 100 cent. cubes (culots). Aucun incident pendant toute la durée du traitement. — (Les sérums des six cobayes ont été mélangés et constituent le sérum 312 C (cob.) dont il sera question plus loin.)

2° PROPRIÉTÉS DES SÉRUMS

Nous désignerons nos sérums par les noms des pneumocoques qui ont servi à les préparer. Nous aurons donc les sérums A. H. 286 O, 286 S, 286 L, 286 C, 312 O, 312 C.

Le pneumocoque 312 O ayant été inoculé au mouton et au lapin, il y a lieu de distinguer un sérum 312 O (mout.) et un sérum 312 O (lap.). De même nous avons deux sérums 312 C : 312 C (mout.) et 312 C (lap.).

Les quatre sérums 286 ne se distinguant guère que par des différences quantitatives, le sérum 286 L, qui est le plus actif d'entre eux, sera seul étudié dans ce qui va suivre.

On sait que nous avons immunisé deux moutons en leur injectant à la fois les deux pneumocoques F et 286 L; les deux sérums ainsi obtenus seront désignés sous les noms de F-286 L (1) et F-286 L (2).

La plupart de nos animaux ont été **saignés** plusieurs fois. Sauf indication spéciale, toutes les expériences que nous allons résumer se rapportent aux sérums de première saignée. Seul, le sérum A provient de la deuxième saignée.

Parallèlement à nos sérums, nous avons étudié celui que M. Flexner nous a obligeamment envoyé, et celui de M. Neufeld. Nous les désignerons, comme les pneumocoques correspondants, par les lettres F et N; tous deux sont des sérums équins.

Les **titrages** ont été faits sur le lapin et sur la souris. Nous n'avons étudié que la *méthode préventive*, l'injection de sérum précédant de vingt-quatre heures celle du pneumocoque. — Les animaux ont été gardés en observation pendant une semaine au moins.

TITRAGE SUR LE LAPIN

Nous avons employé des lapins de 1 kil. 600 à 2 kilogrammes.

Immunisation. — Le sérum est introduit, soit dans la **veine** marginale de l'oreille, soit dans les **muscles** de la cuisse. La **dose** a varié entre 1 et 3 cent. cubes.

Seuls ont été étudiés systématiquement chez le lapin les sérums préparés avec des pneumocoques virulents pour cet animal. Nous n'avons pu, cependant, titrer les sérums 312 O (lap.) et 312 C (cob.), car nous n'en possédions pas en quantité suffisante. Nos recherches n'ont donc porté que sur les sérums 286 L, F, 312 O (mout.), 312 C (mout.). N, F-286 L (1) et F-286 L (2); pour ces deux derniers, les sérums de première et de deuxième saignée ont été utilisés.

Épreuve. — Elle a été faite avec les **échantillons** correspondants (nous avons homologué, pour ces inoculations, les variétés 312 C et 312 O; cette dernière a été seule employée). Les races L 2 et L 1 ont été l'objet de quelques expériences complémentaires.

Les cultures sont injectées **sous la peau** du ventre, exceptionnellement dans la **veine** de l'oreille.

Les **doses** varient entre 10^{-2} et 10^{-5} cent. cube, selon la virulence.

Chaque expérience comprend deux lapins immunisés et un nombre variable de témoins.

Résultats. — Les résultats sont d'une remarquable uniformité (voir tableau 10).

Tous les sérums préparés a l'aide d'un seul échantillon donnent l'immunité vis-a-vis du pneumocoque qui a servi a les préparer : le sérum 286 L immunise le lapin contre la race 286 L, le sérum N protège contre la race N, etc. — *Mais là se borne leur domaine.* Chacun d'eux n'exerce son action sur aucun autre pneumocoque. Titrés sur le lapin, ces sérums apparaissent donc comme étant strictement monovalents.

(Les sérums 312 O (mout.) et 312 C (mout.) ont, il est vrai, déterminé un retard dans la mort des lapins inoculés avec l'échantillon F ; mais il ne s'agit là que d'actions bien faibles, sans grande valeur, par conséquent.)

Puisqu'un seul pneumocoque donne naissance à un sérum *monovalent*, deux pneumocoques devront, semble-t-il, fournir un sérum *bivalent*. En d'autres termes, les propriétés d'un sérum préparé à l'aide de deux pneumocoques seront au moins la somme des propriétés des deux sérums fournis séparément par chacun de ces deux pneumocoques.

C'est pour vérifier cette hypothèse que nous avons préparé les sérums F-286 L. Nous nous attendions à les voir agir à la fois sur l'échantillon F et sur l'échantillon 286 L. Mais la vérité est tout autre. Nos expériences ne laissent place à aucun doute à ce sujet. Les deux sérums F-286 L (1re saignée) agissent l'un, à peine, l'autre, incomplètement, sur le pneumocoque 286 L ; sur F, l'action est absolument nulle. L'activité des sérums de 2e saignée est encore moindre : infiniment faible vis-à-vis de F, leur pouvoir immunisant a totalement disparu à l'égard de 286 L.

Disons, par anticipation, et pour n'y plus revenir, que des titrages, peu nombreux d'ailleurs, faits avec les sérums F-286 L sur la souris, nous ont donné des résultats tout à fait semblables à ceux obtenus chez le lapin.

Cette question mériterait peut-être d'être reprise sur une plus grande échelle ; mais les faits que nous venons d'exposer restent acquis. Ils n'encouragent pas à poursuivre dans cette voie.

TABLEAU X. — **Immunité passive chez le lapin.**

SÉRUMS	PNEUMOCOQUES EMPLOYÉS POUR L'ÉPREUVE					
	286 L	F	312 O	N	L 2	L 1
Sérum 286 L	+	—	—		—	
	+	—	—		—	—
Sérum F	—	+	—		—	—
	—	+	—			—
Sérum 312 O (mout.)	—	...	+		—	
	—	...	+		—	
Sérum 312 C (mout.)	—	..	+		—	
	—	...	+		—	
Sérum N		—	—	+		
		—	—	+		
Sérum F-286 L — 1re saignée. Sérum (1)	...	—				
	—	—				
Sérum F-286 L — 1re saignée. Sérum (2)	+	—				
	—	—				
Sérum F-286 L — 2e saignée. Sérum (1)	—	—				
	—	—				
Sérum F-286 L — 2e saignée. Sérum (2)	—	...				
	—	...				

\+ : Survie.
— : Mort dans les mêmes délais que les témoins.
... : Mort avec retard.
Chaque signe correspond à un lapin.

TITRAGE SUR LA SOURIS.

Nous avons employé des souris blanches, mâles, pesant de 16 à 20 grammes.

Immunisation. — Les sérums ont été injectés **sous la peau** ou **dans les muscles** d'une des pattes postérieures.

Sauf mention spéciale, la **dose** injectée a été de 1/2 cent. cube.

Tous les sérums, ceux que nous avons préparés nous-même, comme ceux de M. Flexner et de M. Neufeld, ont été étudiés.

Épreuve. — Elle a été faite par **voie** sous-cutanée.

Les **échantillons** employés pour l'épreuve sont les pneumocoques **F, 312 O, L 2, N, 286 L et H.**

Chez les quatre premiers, la virulence pour la souris est la même (10^{-7} cent. cube). Dans tous nos titrages, nous avons inoculé 10^{-3} cent. cube de ces échantillons, c'est à-dire 10.000 doses mortelles. Quant aux pneumocoques 286 L et H, la **dose** à inoculer était beaucoup plus difficile à fixer. Comme nous l'avons fait remarquer chap. II, la virulence de la race H pour la souris, très grande à l'origine, a baissé progressivement : fragilité particulière de ce germe, défectuosité passagère des milieux de culture, peu importe la cause. Toujours est-il qu'au moment du titrage des sérums, H tuait la souris inconstamment à 10^{-2} cent. cube. On a vu d'autre part que les passages par le lapin ont eu l'effet inattendu de faire baisser la virulence du pneumocoque 286 pour la souris ; la variété 286 L tue cet animal irrégulièrement à 10^{-1} cent. cube. Impossible, par conséquent, de songer à inoculer 10.000 doses mortelles de ces deux échantillons. On se souvient que, dans nos expériences sur l'immunité active, la même difficulté s'était présentée ; ici comme là, il nous a fallu la résoudre d'une façon un peu arbitraire, en cherchant une dose qui, tout en tuant à coup sûr les témoins, ne fût pas trop massive. L'activité des deux échantillons en cause est si peu prononcée que nous avons été obligée de nous tenir très près de la dose limite. Celle que nous avons choisie a varié légèrement dans le cours de nos expériences. Au moment où la virulence était le plus faible, nous avons inoculé 10^{-1} cent.

cube du pneumocoque H et 1/2 cent. cube du pneumocoque 286 L.

Chaque expérience comprend deux souris immunisées et un nombre variable de témoins.

Exposé et discussion des résultats. — Les résultats obtenus avec les sérums F-286 L ayant déjà été mentionnés, il n'en sera plus question ici.

Toutes les expériences de titrage sur la souris sont résumées dans le tableau 11. Le sort des témoins n'y est pas indiqué ; il suffit de rappeler que, dans tous les cas, les témoins inoculés aux mêmes doses que les souris immunisées, mouraient ; le plus souvent même, la mort survenait pour une dose notablement inférieure. — Chaque signe de notre tableau se rapporte à *une* souris immunisée.

Étudions successivement l'action des neuf sérums sur les six échantillons employés pour l'épreuve.

Le sérum A protège la souris contre le pneumocoque H exclusivement, et, du reste, imparfaitement.

Le sérum H agit, mais très incomplètement, sur deux échantillons : H et N.

Le sérum 286 L protège un peu mieux que le précédent contre le pneumocoque H ; mais il n'immunise pas contre le pneumocoque 286 L, qui a cependant servi à le préparer. (Nous reviendrons plus loin sur ce point.)

Les sérums F et N agissent nettement, et de façon presque identique, sur les échantillons F, N, 312 O et L2.

Des deux sérums 312 C, celui préparé chez le *mouton* est incontestablement le meilleur puisqu'il agit, plus ou moins complètement d'ailleurs, sur les cinq échantillons H, 312 O, F, L2 286 L, tandis que le sérum 312 C (*cob.*) protège seulement contre trois d'entre eux (312 O, F et L2).

Entre les deux sérums 312 O la différence est plus faible. Le sérum de *lapin* protège complètement contre N, 312 O, F et L2, incomplètement contre 286 L; il n'agit pas sur H. Le sérum de

TABLEAU XI. — **Immunité passive chez la souris.**

SÉRUMS	PNEUMOCOQUES EMPLOYÉS POUR L'ÉPREUVE					
	H	N	312 O	F	L 2	286 L
Sérum A.	+	—	—	—	—	—
	...	—	—	—	—	—
Sérum H.	+	+	—	—	—	—
	-	—	—	-	—	—
Sérum 286 L	+	—	—	—	—	—
	...	—	—	—	—	—
Sérum F.	—	+	+	+	+	—
	—	+	+	+	+	—
Sérum N.	—	+	+	+	+	—
	—	+	+	+	...	—
Sérum 312 C (cob.).	—	—	+	+	+	—
	—	—	+	+	—	—
Sérum 312 C (mout.). . . .	+	—	+	+	+	+
	--	—	+	+	+	—
Sérum 312 O (lap.)	—	+	+	+	+	+
	—	+	+	+	+	—
Sérum 312 O (mout.)	+	+	+	+	+	+
	—	...	+	+	+	—

+ : Survie.
— : Mort dans les mêmes délais que les témoins.
... : Mort avec retard.
Chaque signe correspond à une souris.

mouton confère l'immunité totale ou presque totale vis-à-vis de N, 312 O, F et L 2, incomplète vis-à-vis de H et de 286 L; dans aucun cas, l'action n'a été nulle; le sérum 312 O (mout.) agit donc, avec des différences de degrés, sur *tous* les échantillons employés pour l'épreuve.

Si on laisse de côté le sérum A, qui n'a pu être titré par rapport au pneumocoque A, celui-ci étant trop peu virulent, — on voit que CHAQUE SÉRUM AGIT, PLUS OU MOINS ÉNERGIQUEMENT, SUR L'ÉCHANTILLON QUI A SERVI A LE PRÉPARER.

Seul le sérum 286 L fait exception à cette règle; mais seul aussi le pneumocoque 286 L a dû être inoculé à la dose considérable de 1/2 cent. cube; il est inutile de chercher ailleurs l'explication de l'anomalie que présente ce sérum. Nous avons fait remarquer, à plusieurs reprises, combien l'intervention du facteur « masse » pouvait troubler la comparabilité des expériences; on en voit ici un exemple frappant. — Nous savons du reste que le sérum 286 L protège le *lapin* contre 10^{-2} cent. cube du pneumocoque 286 L; il est donc évident que ce sérum contient des anticorps 286 L. D'autre part (expérience non rapportée dans notre tableau), le sérum 286 L protège la souris contre 10^{-2} cent cube de l'échantillon *286 O* plus virulent pour la souris que la variété 286 L. Ces faits justifient indubitablement notre interprétation.

CHACUN DE NOS SÉRUMS EXERCE SON ACTION SUR D'AUTRES ÉCHANTILLONS QUE CELUI QUI A SERVI A LE PRÉPARER.

Laissant de côté momentanément les sérums de cobaye et de lapin, on voit que le nombre de ces échantillons est de :

1 pour les sérums A, H et 286 L,
3 — F et N.
4 pour le sérum 312 C (mout.),
5 — 312 O (mout.).

Les notions acquises par nos expériences d'immunité active vont nous permettre d'analyser rapidement ces résultats.

Un premier fait ressort avec évidence : c'est que SEULS LES PNEUMOCOQUES TRÈS VIRULENTS ONT FOURNI DES SÉRUMS A DOMAINE ÉTENDU (sérums F, N, 312 C (mout.) et 312 O (mout.).

Inversement, un pneumocoque presque avirulent (A) ou peu

virulent (II) ne peut être le point de départ d'un sérum doué d'un grand champ d'action. LA NÉCESSITÉ DE RECOURIR A UN PNEUMOCOQUE TRÈS VIRULENT POUR PRÉPARER UN SÉRUM MULTIVALENT NOUS APPARAÎT DONC COMME ABSOLUE.

Mais il ne faut pas se faire des rapports de la virulence et de l'étendue du pouvoir antigène une conception trop étroite. Nos expériences d'immunité active, véritablement schématiques, ne doivent pas nous entraîner trop loin en ce sens. On se rappelle, en effet, que nos échantillons, classés par nombre croissant d'antigènes élémentaires, se trouvaient par cela même rangés par ordre de virulence croissante. Le parallélisme entre les deux propriétés paraissait complet, et il semblait qu'on fût en droit de les considérer comme étant « *fonction* » l'une de l'autre.

Nos expériences sur l'immunité passive nous montrent qu'il convient d'élargir un peu cette formule. L'étendue du domaine d'un sérum n'est pas, en effet, *rigoureusement proportionnelle* à la virulence du pneumocoque qui a servi à le préparer. NOUS N'AVONS JAMAIS OBTENU DE SÉRUM A GRAND DOMAINE AVEC UN ÉCHANTILLON PEU VIRULENT; MAIS LA RÉCIPROQUE N'EST PAS VRAIE : NOUS N'AVONS PAS TOUJOURS OBTENU UN SÉRUM A DOMAINE ÉTENDU AVEC UNE RACE VIRULENTE.

Les exemples suivants préciseront les idées. — A l'échantillon 286 L qui tue le lapin à 10^{-4} cent. cube correspond un sérum très peu actif. Un germe virulent ne fournit donc pas forcément un sérum à domaine très étendu. — De même, un pneumocoque peut être plus virulent qu'un autre, et cependant fournir un sérum à domaine plus restreint. C'est le cas de l'échantillon 312 C. Sa virulence est plus considérable que celle de tous les autres échantillons étudiés ici, plus grande, en particulier, que celle de 312 O (vis-à-vis du cobaye tout au moins). Cependant, le sérum 312 C (mout.) est moins actif que le sérum 312 O (mout.). Les différences ne sont, certes, pas considérables, mais elles retiennent l'attention parce qu'on s'attendait à ce qu'elles fussent en sens inverse.

(Peut-être, d'ailleurs, faut-il chercher l'explication de ces faits dans la particularité que les pneumocoques 286 L et 312 C sont des variétés obtenues par passages continus à travers l'organisme animal. A ce procédé de « forçage » correspondent des virulences « forcées », artificielles, qui s'écartent de la loi commune.)

Quoi qu'il en soit, nous pensons nous conformer strictement aux données expérimentales en disant que, si un pouvoir antigène étendu se rencontre *exclusivement* chez les pneumocoques très virulents, il ne s'y rencontre pas *nécessairement*; il y a coexistence habituelle, très fréquente, mais non fatale de ces deux propriétés.

Si étendu que soit le domaine d'un sérum, il est exceptionnel qu'il agisse avec la même intensité sur tous les échantillons. Le sérum 312 O (mout.), par exemple, agit mieux sur 312 O, F et L 2 que sur H, N et 286 L. — Son pouvoir protecteur vis-à-vis d'une race donnée peut même être moindre que celui d'un sérum à domaine plus restreint : ainsi le sérum 312 O (mout.) protège incomplètement, le sérum F complètement, contre la race N; cependant le sérum 312 O (mout.) est plus actif, d'une manière générale, que le sérum F.

L'étude de l'immunité active ne nous avait pas permis d'établir de groupes de pneumocoques. Celle de l'immunité passive ne nous apprend pas grand'chose de plus à ce sujet. On y rencontre les mêmes difficultés pour la délimitation des soi-disant groupes. Le sérum H, par exemple, immunise (incomplètement) contre N; le sérum N n'agit pas sur H. Les échantillons H et N appartiennent au même groupe d'après le sérum H, mais n'ont aucune parenté selon le sérum N. Même cas pour les sérums 312 O et 286 L. — Les sérums F et N, venant de pays si éloignés, ont, il est vrai (mais chez la souris seulement), des domaines identiques, et constituent le seul exemple de groupe qui se soit présenté au cours de cette longue étude. Que l'on puisse, de temps à autre, rencontrer deux germes à peu près semblables, cela ne nous surprend pas; mais que l'on estime possible de classer tous les pneumocoques en trois ou quatre groupes, et que l'on fonde sur ce principe une méthode sérothérapique, cela nous paraît difficilement concevable.

Nos moutons ont été immunisés avec des *microbes vivants*, les cobayes et le lapin avec des *germes tués par la chaleur*. Malgré l'absence de comparabilité due à la diversité des espèces animales employées, on peut conclure de nos titrages, que la cha-

LEUR NE DÉTRUIT PAS LE POUVOIR ANTIGÈNE. Le sérum 312 O (lap.), préparé avec des pneumocoques morts, est l'un des meilleurs que nous ayons obtenus. D'autre part, le traitement par la chaleur empêche naturellement la multiplication *in vivo*, qui, chez le mouton, animal cependant beaucoup moins sensible que le lapin, constitue un redoutable danger. Nous pensons donc qu'il y aurait tout avantage à essayer d'immuniser les grands animaux avec des germes tués soit par un chauffage à 55°, soit, éventuellement, par d'autres moyens.

Pour obtenir un bon sérum, le CHOIX DE L'ANIMAL A HYPERIMMUNISER n'est pas indifférent. Si nous comparons les sérums 312 O (mout.) et 312 O (lap.), on voit que leur domaine est presque identique, celui du premier étant cependant un peu plus étendu. Mais le sérum de lapin est actif à plus faible dose; en effet, 10^{-1} cent. cube du sérum 312 O (lap.) protège la souris contre 10^{-2} cent. cube de l'échantillon 312 O; la même dose du sérum 312 O (mout.) demeure sans effet contre 10^{-3} cent. cube, c'est-à-dire une quantité dix fois moindre de ce même échantillon. — Au contraire, le sérum 312 C (cob.) n'est pas plus actif, et a un domaine bien moins étendu que celui du sérum 312 C (mout.). Nous avons déjà attiré l'attention sur ce fait que le cobaye, animal particulièrement peu sensible au pneumocoque, fournit cependant difficilement des anticorps vis-à-vis de cette espèce microbienne.

Les sérums de nos moutons ont été titrés à la première et à la deuxième SAIGNÉE. Les résultats que nous venons d'étudier se rapportent, nous l'avons dit, aux sérums de première saignée. *Constamment* les sérums de deuxième saignée leur ont été nettement inférieurs. L'optimum, rapidement atteint, est suivi d'une diminution d'activité même quand on ne peut invoquer, chez l'animal immunisé, des accidents toxiques ou infectieux susceptibles d'amoindrir son pouvoir « antipoïétique ». Il est possible, d'ailleurs, que la baisse des anticorps ne soit que momentanée, et que les sérums eussent retrouvé ou même dépassé leur activité première si l'on avait poursuivi le traitement; cela nous paraît toutefois peu probable.

La plupart de nos sérums, titrés sur la souris, étendent leur action à plusieurs pneumocoques. Titrés sur le lapin, chacun de ces sérums agit, on s'en souvient, exclusivement sur l'échantillon qui avait servi à le préparer.

Pourquoi y a-t-il MONOVALENCE CHEZ LE LAPIN ET MULTIVALENCE CHEZ LA SOURIS?

Mais pourquoi aussi peut-on immuniser activement le lapin et pas la souris?

Pourquoi, en d'autres termes, la souris est-elle incapable de produire un anticorps personnel, et profite-t-elle, au contraire, non seulement d'un anticorps étranger principal, mais aussi d'anticorps accessoires?

On ne peut expliquer ces faits que par une activité énorme du complément de la souris par rapport au complément de lapin. Il y a, en effet, dans certaines conditions expérimentales, une sorte de suppléance entre l'ambocepteur et le complément, en ce sens qu'un complément puissant révèle un ambocepteur très faible qui ne se manifesterait pas avec un complément peu actif. Et *vice versa*.

Chez le lapin *activement* immunisé, la force des ambocepteurs permet de suppléer à la faiblesse du complément. Dans les mêmes conditions, la souris ne produit pas d'ambocepteurs; son puissant complément ne lui sert donc à rien.

S'agit-il, au contraire, d'immunité *passive* : le complément peu actif du lapin est incapable de révéler des ambocepteurs accessoires trop faibles; d'où monovalence des sérums titrés sur cet animal. Chez la souris, au contraire, tous les ambocepteurs sont mis en évidence grâce à la force du complément; d'où multivalence.

3° CONCLUSIONS

Les propriétés d'un sérum antipneumococcique dépendent essentiellement de deux facteurs : le pneumocoque immunisant, et l'animal hyperimmunisé.

Mais à la *manifestation* de ces propriétés participe un troisième facteur : l'animal passivement immunisé.

Le pneumocoque immunisant. — 1. Il est impossible d'obtenir un sérum actif avec un pneumocoque avirulent ou peu virulent.

2. Un sérum a grand domaine ne peut être obtenu qu'a l'aide d'un pneumocoque très virulent.

3. Deux pneumocoques capables de provoquer, si on les injecte séparément a deux animaux différents, la formation de deux sérums doués d'une certaine activité, peuvent ne plus fournir, injectés simultanément a un même animal, qu'un sérum inactif.

4. Il est possible de préparer un bon sérum avec des germes tués par la chaleur ; un chauffage modéré, mais suffisant pour déterminer la mort, ne détruit donc pas le pouvoir antigène du pneumocoque.

L'animal hyperimmunisé. — 1. Certains animaux sont plus aptes que d'autres à créer des substances antipneumococciques.

2. Les propriétés « antipoiétiques » du lapin sont au moins égales à celles du mouton ; celles du mouton nettement supérieures à celles du cobaye.

L'animal passivement immunisé. — 1. Ce qui ressort de nos expériences, c'est que l'animal passivement immunisé n'est pas rigoureusement « passif », mais qu'il peut intervenir, au contraire, activement, pour révéler les propriétés du sérum qu'on lui injecte.

2. Pour apprécier l'étendue du pouvoir d'un sérum antipneumococcique, il faut le titrer, non sur le lapin, mais sur la souris.

CONCLUSIONS

APPLICATION DES DONNÉES EXPÉRIMENTALES A LA PRÉPARATION D'UN SÉRUM ANTIPNEUMOCOCCIQUE

Des nombreuses expériences que nous venons de résumer, de recherches analogues, non exposées ici et portant sur divers sérums préparés par nous-même ou par d'autres, — nous devons conclure qu'il n'existe pas actuellement, à notre connaissance, de sérum antipneumococcique assez actif pour que son emploi en thérapeutique humaine s'impose.

Nous n'avons donc pas la prétention d'avoir résolu le problème de la sérothérapie antipneumococcique. Nous estimons, cependant, que de notre travail se dégagent certaines données essentielles susceptibles d'éclairer et de guider les recherches ultérieures sur le même sujet. Ce sont ces notions fondamentales que nous voudrions rappeler dans ce chapitre, nous attachant surtout à montrer quel parti on en peut tirer, dans la pratique, pour la préparation d'un sérum antipneumococcique.

Mais il est nécessaire tout d'abord de faire comprendre comment se pose le problème. Le but d'un sérum antipneumococcique est d'être employé en thérapeutique humaine. Un malade étant atteint d'une affection à pneumocoques, il nous

faut pouvoir agir contre ces microbes desquels nous ne savons rien si ce n'est que ce sont des pneumocoques.

Certains auteurs admettent que les pneumocoques forment un petit nombre de groupes homogènes; il suffirait donc d'obtenir les sérums correspondants, de les injecter tous au malade, pour être sûr d'agir sur l'agent de son infection. Mais rien, selon nous, n'autorise cette manière de voir.

Un sérum monovalent ne sera d'aucune utilité : il faudrait que le malade eût eu la bonne fortune d'être infecté par l'échantillon même qui a servi à préparer ce sérum, hypothèse pratiquement inadmissible.

On a cherché à tourner la difficulté en hyperimmunisant un animal avec un grand nombre de pneumocoques dont chacun, injecté séparément, fournirait un sérum monovalent. Mais en supposant (ce qui est faux) que le sérum préparé avec un nombre n de pneumocoques soit forcément « n-valent », comment agirait-il sur le microbe du malade, presque sûrement différent de ces n pneumocoques?

Le problème consiste, en somme, a préparer, avec un nombre limité, fini, d'échantillons, un sérum susceptible d'agir contre un nombre illimité, infini, d'échantillons de la même espèce microbienne.

C'est dire que, si chaque pneumocoque ne peut immuniser que contre lui-même, l'obstacle est infranchissable; la solution sera, au contraire, sinon aisée, du moins théoriquement possible, s'il existe des échantillons doués d'un pouvoir antigène très vaste.

Nous nous sommes donc proposé, au cours de ce travail, d'établir quels étaient les rapports qui existaient entre les pneumocoques au point de vue de leurs propriétés immunisantes.

Nous pensons avoir démontré qu'il y avait, à cet égard, de considérables différences individuelles, et qu'il était indispensable de les connaître pour aborder avec profit l'étude de la sérothérapie antipneumococcique.

Il y a, en effet, des échantillons qui sont presque totalement dépourvus de propriétés antigènes; il en existe d'autres, susceptibles de fournir des sérums moyennement actifs, mono- ou

paucivalents; enfin on en peut rencontrer de tout à fait remarquables par l'étendue de leur domaine antigène, échantillons véritablement « REPRÉSENTATIFS » de l'espèce pneumocoque.

Pour la préparation d'un sérum antipneumococcique c'est exclusivement à un de ces germes exceptionnels qu'il convient de recourir.

Comment, en pratique, trouver ces pneumocoques d'élite? Existe-t-il des caractères permettant de les reconnaître, de les distinguer des autres échantillons de qualité inférieure?

Nous y avons souvent insisté dans ce travail : LES PNEUMOCOQUES A DOMAINE ÉTENDU SONT TOUJOURS DOUÉS D'UNE GRANDE VIRULENCE. Il s'agit, par conséquent, de chercher des germes très virulents. On pourrait évidemment titrer tous les échantillons que l'on viendrait à isoler. Mais on fera une notable économie de temps et de travail en se rappelant que LES PNEUMOCOQUES TRÈS VIRULENTS SONT SOLUBLES DANS LA BILE. Une expérience préliminaire, *l'épreuve de la bile*, simplifiera donc considérablement les recherches : tout échantillon insoluble sera rejeté sans hésitation; seuls les pneumocoques solubles seront l'objet d'une étude plus approfondie.

Ayant ainsi éliminé un grand nombre de germes inutilisables, il faudra titrer sur les animaux de laboratoire la virulence des échantillons solubles. Un nouveau triage se fera ainsi. L'expérience nous a montré que LES PNEUMOCOQUES A GRAND DOMAINE ANTIGÈNE SONT TOUJOURS TRÈS VIRULENTS POUR LE LAPIN. Un germe qui déterminerait la mort de la souris, même à une dose minime, mais qui serait avirulent pour le lapin, ne nous paraîtrait donc pas digne de nous arrêter au point de vue qui nous occupe. Il y a lieu, à notre avis, de ne retenir que les échantillons susceptibles de tuer le lapin à faible dose (10^{-5} cent. cube au plus). Si à la virulence pour le lapin se joint celle pour le *cobaye*, l'échantillon se recommandera tout particulièrement à notre attention.

(Rappelons qu'il est inutile de chercher à créer une grande virulence par les passages à travers l'organisme animal, cette pratique n'étant qu'exceptionnellement couronnée de succès; même en cas de réussite, l'accroissement de virulence ne

s'accompagne pas forcément d'une augmentation du pouvoir antigène.)

Après ces diverses épreuves, il ne restera plus qu'un nombre très restreint de pneumocoques, parmi lesquels nous aurons bien des chances de trouver les germes d'élite, objet de nos recherches.

De ces quelques échantillons, tous virulents, lequel a le pouvoir antigène le plus vaste ? Il est impossible de résoudre cette question par voie détournée. Même si l'un de ces germes est un peu plus virulent que les autres, cela n'implique pas nécessairement un pouvoir antigène plus étendu, puisque, nous l'avons dit, le parallélisme entre les deux propriétés n'est pas absolu. — Il va donc falloir étudier directement le pouvoir immunisant de nos échantillons.

Il y a avantage à commencer par des expériences d'IMMUNITÉ ACTIVE. On fait ainsi un dernier triage avant d'en arriver à l'hyperimmunisation des grands animaux.

Pour l'immunité active, l'animal de choix est le *lapin*. On le vaccinera avec des microbes tués par la chaleur ; l'épreuve sera faite avec des races variées et nombreuses, aussi différentes les unes des autres que possible quant à leur origine et leurs caractères.

En comparant l'étendue du pouvoir antigène des divers échantillons étudiés de la sorte, on pourra reconnaître celui qu'il conviendra de choisir pour la préparation d'un sérum.

Cette façon d'agir est passible d'une critique, les propriétés « anti-poïétiques » de tous les animaux n'étant pas identiques. Le lapin peut être capable de fournir certains anticorps que le mouton, par exemple, est inapte à fabriquer — et *vice versa*. Tel échantillon qui paraîtrait, chez le lapin, avoir un pouvoir antigène étendu pourrait en avoir un moindre (ou différent) chez le mouton ; inversement, un domaine considérable, chez le mouton, pourrait correspondre à un domaine plus restreint chez le lapin.

Mais cette objection a une valeur plus théorique que réelle. Le lapin constitue le meilleur des réactifs vis-à-vis des antigènes pneumococciques, et l'on ne risque pas, en suivant notre méthode, de laisser passer inaperçu un échantillon digne de retenir l'attention, seule éventualité à redouter. En fait, d'ailleurs, nous n'avons jamais

observé de résultats contradictoires, et les sérums ovins et équins que nous avons eus entre les mains sont bien tels que les faisaient prévoir les expériences d'immunité active du lapin.

Il peut arriver qu'aucun des échantillons étudiés chez le lapin ne soit doué d'un pouvoir antigène très étendu. On ne devra pas s'en étonner. Le nombre des pneumocoques « représentatifs » est certainement fort restreint, et il faut parfois des années de recherches assidues avant de réussir à en trouver. En cas d'échec, il n'y a donc qu'à continuer patiemment à isoler des pneumocoques et à les soumettre aux divers critériums que nous venons de passer en revue.

Si, au contraire, un échantillon se montre capable de vacciner le lapin contre la majorité ou la totalité des races employées pour l'épreuve, il ne restera plus qu'à l'utiliser en vue de l'obtention d'un sérum.

Pour l'HYPERIMMUNISATION, nous nous sommes adressée surtout au mouton. Il y aurait probablement avantage à recourir au cheval, le pouvoir de former des anticorps étant, d'une façon générale, très grand chez cet animal. Mais n'ayant pas encore fait d'étude systématique de cette question, nous ne sommes pas en mesure d'y répondre.

Quel que soit l'animal choisi, il est indispensable de l'immuniser avec des *germes morts*. Un chauffage modéré (une demi-heure à 55°) laisse intact le pouvoir antigène, et supprime le danger d'accidents infectieux qui déterminent trop souvent la mort des animaux, si prudemment qu'ait été mené le traitement.

Le sérum une fois obtenu, il s'agit de le TITRER. Nous donnons la préférence à la méthode préventive. Mais, sur quel animal convient-il de faire le titrage ? On ne peut hésiter qu'entre la *souris* et le *lapin* : chacun d'eux répond à des indications précises et nous renseigne de façon différente.

La plupart des pneumocoques virulents ne le sont que pour la souris ; le nombre de ceux capables de tuer le lapin est relativement restreint. En s'adressant à la souris, on peut donc effectuer le titrage sur une beaucoup plus vaste échelle. D'autre part, à cause, croyons-nous, de la force de son complément, la souris

met bien en valeur les anticorps, même faibles, contenus dans les sérums antipneumococciques ; elle permet ainsi d'apprécier l'étendue du domaine de ceux-ci.

Chez le lapin, au contraire, seuls les anticorps très forts manifestent leur présence. Aussi la polyvalence révélée par le lapin aurait-elle une signification toute spéciale, et ne faut-il pas négliger de la rechercher. Un sérum polyvalent chez la souris peut être un sérum faible, malgré l'étendue de son champ d'action ; la polyvalence chez le lapin impliquerait la présence d'anticorps puissants. Il ne nous a jamais été donné de l'observer.

Existe-t-il un pneumocoque capable d'immuniser contre tous les autres pneumocoques, une race à domaine en quelque sorte infini ?

Mais même si un semblable germe se rencontrait, il est probable que *l'intensité* de son action varierait selon les échantillons. Un pneumocoque est un complexe formé d'antigènes élémentaires, les uns dominants, les autres accessoires ; si grand que soit son domaine, il semble que cette inégale répartition de ses parties constituantes doive subsister. Un pneumocoque immunisera donc toujours mieux contre certains échantillons que contre d'autres.

Par conséquent, il n'est peut-être pas possible, même en faisant l'hypothèse d'un pneumocoque idéal, à domaine infini, d'arriver à la polyvalence absolue avec une seule race. A plus forte raison, cela doit-il être irréalisable dans la pratique. Aussi pensons-nous qu'il faudrait s'efforcer de trouver des pneumocoques « représentatifs » qui se *compléteraient* mutuellement, chacun d'eux étant formé d'antigènes dominants nombreux, mais différents.

Comment faudrait-il utiliser de tels échantillons en vue de l'obtention d'un sérum ? Il est absolument contre-indiqué de les employer à hyperimmuniser un seul et même animal. Les essais que nous avons faits en ce sens n'ont abouti qu'à un échec total.

On devra donc PRÉPARER AUTANT DE SÉRUMS QUE L'ON AURA D'ÉCHANTILLONS.

Les sérums seront ensuite mélangés et l'on procédera au titrage sur la souris et le lapin.

Si le mélange se montre actif chez la souris, vis-à-vis d'un grand nombre de races de pneumocoques, si la polyvalence se maintient chez le lapin, on aura quelque chance d'avoir obtenu un résultat dont pourra bénéficier la thérapeutique humaine.

Vu par le président de la thèse :

MARFAN.

Vu :

Le Doyen : L. LANDOUZY.

Vu et permis d'imprimer,

Le vice-recteur de l'Académie de Paris,

L. LIARD.

TABLE DES MATIÈRES

AVANT-PROPOS 11

INTRODUCTION 13

CHAPITRE PREMIER. — Technique générale. 17

CHAPITRE II. — Caractères des pneumocoques étudiés dans ce travail 22

CHAPITRE III. — Immunité active 33

CHAPITRE IV. — Immunité passive. 48

CONCLUSIONS. — Application des données expérimentales à la préparation d'un sérum antipneumococcique 67

Paris. — L. MARETHEUX, imprimeur, 1, rue Cassette. — 20248.